平成17年度　環境技術実証モデル事業

化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術
実証試験結果報告書

環境技術開発者	株式会社ホリバ・バイオテクノロジー
技術・製品の名称	《技術名》　ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》　フルトラニル測定キットE

平成１８年３月

鳥　取　県

はじめに

環境技術実証モデル事業は、既に適用可能な段階にありながら、環境保全効果等についての客観的な評価が行われていないために普及が進んでいない先進的環境技術について、その環境保全効果等を第三者が客観的に実証する事業をモデル的に実施することにより、環境技術実証の手法・体制の確立を図るとともに、環境技術の普及を促進し、環境保全と環境産業の発展に資することを目的とするものである。

本実証試験は、平成１７年５月１６日環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領第２版に基づいて選定された実証対象技術について、同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで、製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

（実証項目）

- 製品性能の信頼性
- 一般環境モニタリングでの実用性
- 製品操作等の簡便性

本報告書は、その結果を取りまとめたものである。

（実証機関）
鳥取県生活環境部衛生環境研究所

所　長　　　杉　本　雅　美

要　　　　　　約

製品名称	フルトラニル測定キットE
環境技術開発者	株式会社ホリバ・バイオテクノロジー
実証機関	鳥取県
対象物質	フルトラニル
実証試験の実施期間	平成17年10月28日～平成17年12月14日

１．実証対象技術の概要

この実証対象製品は、フルトラニルに対する特異的な抗体を応用した、環境水のフルトラニル測定ELISAキットである。

ELISAの原理は、競合反応（フルトラニル濃度が高い試料では吸光度が低く、フルトラニル濃度が低い試料では吸光度が高い）で、マイクロプレート（96ウェル）を使用したキットである。

２．実証試験の概要

実証試験項目の内容は、次のとおりである。

項　　目	内　　　　容
１．基本的な性能	
(1)測定範囲	市販標準品で調製した指定濃度系列の試験用試料（濃度既知）を用いたELISA測定値の変動等に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(2)検出下限及び定量下限	市販標準品で調製した指定濃度系列の試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによるELISA測定値の標準偏差に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(3)繰返し再現性	市販標準品で調製した指定濃度系列の中央付近の試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによるELISA測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(4)日間再現性	同一測定者が市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なる条件（日付）での同一操作によるELISA測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(5)期間再現性	市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて製造後一定期間経過した製品の操作によるELISA測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(6)プレート間再現性	市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なるロットや異なるプレート間でのELISA測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(7)交差反応性	市販標準物質及び類似物質を用い調製した指定濃度系列の試験用試料（濃度既知）を用いて類似物質別のELISA測定値の相違等に基づき、交差反応性を実証する。
２．実用的な性能	
(1)回収特性	環境試料を模擬し市販標準品で指定濃度範囲の中央付近の１濃度に混合調製した試験用試料（濃度既知）を用いたELISA測定値の比較に基づき、回収特性を実証する。
(2)測定精度	複数の河川地点から得られた河川水の環境試料（濃度未知）を用いたELISA測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき、測定精度、前処理妥当性、操作簡便性等による環境試料への適用性を実証する。

３．実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、次のとおりである。

項　　目	内　　容
製品名	フルトラニル測定キットＥ
型番	EL105－01
販売・製造元	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
重量（キット一式、g）	350g
価格（円）	99,750 円
分析対象物質	フルトラニル
対象環境媒体	(水質)・底質・生物・その他（　　）
利用用途	環境水その他の水質モニタリング
標準試薬・種類	(付属)（調製済／(調製要)）
操作環境（室温）	常温（15℃～25℃）
製品保管条件	4℃～8℃
製品保証期間	製造後 10 ヶ月間
同時測定数（最多）	46 試料（n=2 で 1 キット使用時）
測定時間	2～3 時間

４．実証試験結果の概要

項目	結果概要	
実証機関	鳥取県	
製品名称	フルトラニル測定キットE	
環境技術開発者	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー	
対象物質	フルトラニル	
実証試験計画書の策定	平成 17 年 10 月	
実証試験の実施期間	平成 17 年 10 月 28 日～平成 17 年 12 月 14 日	
1)　基本的な性能	実験データ	【参考：製品データ】
①測定範囲	調製濃度 1～8μg/L での 相対値　：95 ～ 101 ％ 変動係数：1.3～ 7.4 ％	1～8　μg/L
②検出下限 及び定量下限	調製濃度 1μg/L の SD から求めた 検出下限（3SD）　：0.12 μg/L 定量下限（10SD）：0.40 μg/L 0 濃度から求めた検出下限 ： 0.77 μg/L	測定下限:1μg/L（検出下限、定量下限の記述なし）
③繰返し再現性	調製濃度 2μg/L での 変動係数：4.3　％ 標準偏差：0.082　μg/L	測定濃度2.0～3.9μg/Lでの 標準偏差：0.16～0.29μg/L 変動係数　4.8～6.0% （ほうれんそう）
④日間再現性	調製濃度 1～8μg/L での 変動係数：0.2～8.4　％ 標準偏差：0.004～0.715　μg/L	測定濃度2.0～3.9μg/Lでの 標準偏差：0.06～0.22μg/L 変動係数　1.2～5.4% （ほうれんそう）
⑤期間再現性	調製濃度 1～8μg/L で 1 ヶ月を隔てて 2 回測定した時の変動係数： 0 ヶ月　：2.6～4.3　％ 1 ヶ月後：1.5～10.4　％	保存安定性　10 ヶ月
⑥プレート間再現性	調製濃度 1～8μg/L での変動係数： （同一プレート 2 枚、異プレート 1 枚間） 1.2～6.6　％	－
⑦交差反応性	交差率： メプロニル　36.6　％ オキシカルボキシン　＜0.1　％	交差率： メプロニル 30.1% オキシカルボキシン＜0.1%
2)　実用的な性能		
①回収特性	フルトラニルを添加（2μg/L）した河川水に、フミン酸ナトリウムを添加(0,1,5,10,50mg/L)した試料の回収率: 102～146　％	113～120%（ほうれんそう）
②測定精度等	河川水ろ過水：ELISA 法及び機器分析とも検出下限未満 フルトラニル（2μg/L）添加試験 ELISA法　回収率　：96～114　％ 変動係数：2.6～9.8 ％ GC/MS 法　回収率　：95～96　％ 変動係数：4.4～6.0 ％	－

結果の検討と考察
(1)　製品性能の信頼性 　実証試験で実施した基本性能７項目の全ての結果から申請データ（1～8μｇ/L）の濃度範囲においては、十分な製品性能の信頼性を確認した。 (2)　一般環境モニタリングでの実用性 　回収特性試験においてフミン酸ナトリウム濃度が 50mg/L のとき回収率が 146%となり正の妨害が見られたが、フミン酸ナトリウム 1～10mg/L の範囲では回収率 102～113%と妥当な結果となっており、河川水ろ過水にフルトラニルを添加した実証試験の結果からも水質モニタリング等での実用化が可能であると考えられた。 (3)　製品操作等の簡便性 　一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、試料の前処理がない場合、約３時間で測定結果が得られ、同時に約２６試料（３重測定）の測定が可能であり、本試験での GC/MS－SIM 法では、３試料（３重測定）の測定に約３日が必要であることから操作の簡便性は高いといえる。また、製品に添付された取扱説明書の記述も妥当である。

本　　　　　　編

目　　次

1.　実証試験の概要

1.1　実証対象製品のデータ

実証試験実施者並びに環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

表 1.1.1　実証対象製品のデータ

項　　目	内　　容
技術製品の名称	フルトラニル測定キットＥ
実証申請者	株式会社ホリバ・バイオテクノロジー 代表取締役社長　河野　猛
実証試験実施者	鳥取県生活環境部衛生環境研究所 所長　杉本　雅美
実証試験実施場所	〒682-0704　鳥取県東伯郡湯梨浜町南谷 526-1 鳥取県生活環境部衛生環境研究所
実証試験実施期間	平成 17 年 10 月 28 日～平成 17 年 12 月 14 日
製品名	フルトラニル測定キットＥ
型番	EL105－01
販売・製造元	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
重量（キット一式、g）	350g
価格（円）	99,750 円
分析対象物質	フルトラニル
対象環境媒体	(水質)・底質・生物・その他（　　）
利用用途	環境水その他の水質モニタリング
標準試薬・種類	(付属)（調製済／(調製要)）
操作環境（室温）	常温（15℃～25℃）
製品保管条件	4℃～8℃
製品保証期間	製造後 10 ヶ月間
同時測定数（最多）	46 試料(n=2 で 1 キット使用時)
測定時間	2～3 時間

1.2　実証試験結果

(1)　基本的な性能

①　測定範囲

製品の測定範囲に調製した試験用試料溶液（1,2,4,8μg/L）を測定した実測値の相対値は95～101％、変動係数は1.3～7.4％であった。

（製品のデータ：B/B0 0.8～0.2 付近の濃度として 1～8ppb）

②　検出下限及び定量下限

製品の測定範囲の下限付近（1μg/L）に調製した試験用試料溶液を繰返し（n=8）測定した実測値の標準偏差（SD）から求めた検出下限１（3SD）は、0.12μ g/L、定量下限（10SD）は、0.40μg/L であった。また、指定濃度系列0濃度の吸光度を10回測定し，その標準偏差（SD）から得られる3SD値（吸光度）を0濃度の吸光度から差し引いた吸光度より，検量線を用いて求めた検出下限２は、0.77μg/Lであった。

（製品のデータ：測定範囲の下限値　1μg/L）

③　繰返し再現性

製品の測定範囲の中央付近（2μg/L）に調製した試験用試料溶液を繰返し（3 重測定で8 回）測定した実測値の変動係数は、4.3％（標準偏差0.082μg/L）であった。

（製品のデータ：同時再現性（n=8）として標準偏差：0.16～0.29、変動係数4.8～6.0％（ほうれんそう））

④　日間再現性

製品の測定範囲（1～8μg/L）に調製した試験用試料溶液を、3 日間（1 週間以内）測定した実測値（3 重測定の平均値）の変動係数は、0.2～8.4％（標準偏差0.004～0.715μg/L）であった。

（製品のデータ：3 日間で標準偏差：0.06～0.22、変動係数1.2～5.4％（ほうれんそう））

⑤　期間再現性

製品の測定範囲（1～8μg/L）に調製した試験用試料溶液を、同一ロットの２プレートを用意し、１ヶ月の期間を隔てて２ 回測定した。各試料溶液について３ 重測定を行った各OD 値をそれぞれ濃度に換算した値の変動係数は、0 ヶ月では、2.6～4.3%、1 ヶ月後では、1.5～10.4％であった。

（製品のデータ：保存安定性試験で10ヶ月は安定）

⑥　プレート間再現性

製品の測定範囲（1～8μg/L）に調製した試験用試料溶液を、同一ロットの2 プレート（A,C）と、異なるロットの1 プレート（B）を同日に測定した実測値（3 重測定の平均値）の変動係数は、1.2～6.6％であった。

（製品のデータ：なし）

⑦　交差反応性

交差反応率は、メプロニル 36.6%、オキシカルボキシン＜0.1%であった。

（製品のデータ：メプロニル30.1％、オキシカルボキシン＜0.1％）

(2)　実用的な性能

①　回収特性

河川水ろ過水に測定範囲の中央付近（2μg/L）にフルトラニルを添加し、更にフミン酸ナトリウムを添加（1～50mg/L）した時のフルトラニルの回収率は、102～146%であった。

（製品のデータ：添加回収率111.5～160.9%（ほうれんそう））

②　測定精度等

河川水ろ過水（3 地点）をそれぞれ 3 回測定したところ、フルトラニルの測定値は ELISA 法、GC/MS 法のいずれも検出下限未満（ELISA 検出下限１　0.12μg/L　検出下限２　0.77μg/L　GC/MS 検出下限　0.008μg/L）であった。

また、河川水ろ過水（3 地点）にフルトラニル標準品を添加し、フルトラニル濃度を 2μg/L とした試料を測定したところ、ELISA 法では、変動係数 2.6～9.8%、回収率 96～114%であり、GC/MS 法では、変動係数 4.4～6.0%、回収率 95～96%であった。

（製品のデータ：なし）

2．実証対象技術及び実証対象製品の特性と説明

2.1 実証申請者

企　　業　　名：株式会社ホリバ・バイオテクノロジー
代　　表　　者：代表取締役社長　河野　猛
担当者所属・氏名：試薬事業部開発・製造部　伊東茂壽
住　　　　　所：〒601-8315　京都府京都市南区吉祥院車道町４８番地
電　話　番　号：075-692-1786
Ｆ　Ａ　Ｘ　番　号：075-692-1790
e-mail アドレス：Shigekazu.ito@horiba.com

2.2 実証対象技術の原理

本実証対象製品は、フルトラニルに対する特異的な抗体を応用した、環境水のフルトラニル測定ＥＬＩＳＡキットである。

2.3 実証対象製品のデータ（性能、製品製造者、製品番号等）

実証対象製品のデータは、表2.3に示すとおりである。

表2.3　製品データ

項　　目	内　　容
製品名	フルトラニル測定キットＥ
型番	EL105－01
販売・製造元	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
重量（キット一式、g）	350g
価格（円）	99,750 円
分析対象物質	フルトラニル
対象環境媒体	(水質)・底質・生物・その他（　　）
利用用途	環境水その他の水質モニタリング
標準試薬・種類	(付属)(調製済／(調製要))
操作環境（室温）	常温（15℃～25℃）
製品保管条件	4℃～8℃
製品保証期間	製造後 10 ヶ月間
同時測定数（最多）	46 試料
測定時間	2～3 時間

3.　実証試験実施体制

3.1 実証試験申請者

実　施　責　任　者：鳥取県生活環境部環境政策課長　野間田　憲昭
所　　属　　部　　署：生活環境部環境政策課環境立県戦略担当
担　当　者　氏　名：衛生技師　梁川直宏
住　　　　　　　所：〒680-0011 鳥取県鳥取市東町 1 丁目 220 番地
電　　話　　番　　号：0857－26－7876
Ｆ　Ａ　Ｘ　番　号：0857－22－4240
e-mail アドレス：yanagawan@pref.tottori.jp

3.2 実証試験実施者

実　施　責　任　者：鳥取県生活環境部衛生環境研究所　所長　杉本雅美
実証試験担当者氏名：(ELISA 法)　　　保健衛生室　研究員　金田聡子
　　　　　　　　　(機器分析法)　　食品衛生室　研究員　山根一城
連　　絡　　窓　　口：食品衛生室　研究員　山根一城
住　　　　　　　所：〒682-0704 鳥取県東伯郡湯梨浜町南谷５２６－１
電　　話　　番　　号：0858-35-5421
Ｆ　Ａ　Ｘ　番　号：0858-35-5413
e-mail アドレス：yamane-ka@pref.tottori.jp

3.3 実証試験実施場所

(1) ＥＬＩＳＡ法

鳥取県生活環境部衛生環境研究所保健衛生室

(2) 機器分析法

鳥取県生活環境部衛生環境研究所食品衛生室

3.4 実証試験実施期間

平成 17 年 10 月 28 日～平成 17 年 12 月 14 日

4. 試験方法

4.1　共通して行う試験操作

「4.2 基本的な性能」及び「4.3 実用的な性能」において、以下の方法は共通である。

(1)　製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、品質管理マニュアルに規定した ELISA 法試験標準作業書に従って行った。

(2)　検量線作成用標準溶液の調製

キットに付属するフルトラニル標準試薬を用い、製品の取扱説明書に記載の方法により、指定濃度系列を調製した。

(3)　吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（TECAN 社製スペクトラサーモ）で測定し、検量線作成用標準溶液及び各試験用試料溶液の吸光度とした。

(4)　検量線の作成

プレート毎に同時に測定したゼロブランク（添付の希釈液等）及び検量線作成用標準溶液の吸光度（３重測定の平均値）から、４-parameter logistic fitting後、検量線を作成した。

（検量線作成用の解析ソフト：和光純薬工業（株）製LS-PLATEmanager 2001）

(5)　実測濃度の算出

「(4)　検量線の作成」で作成した検量線を用いて、各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出した。

4.2 基本的な性能

(1) 測定範囲

① 試験条件

本製品の測定範囲における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.1 測定範囲の試験条件

項　目	内　　容
実証項目	基本的な性能・測定範囲（標準試料試験）
対象物質	フルトラニル
対象製品名	フルトラニル測定キットE
製品番号	ロット番号　E-FLN　001F
製造年月日	平成17年9月21日
測定範囲（製品仕様）	1 ～ 8 μg/L
試験日時	平成17年10月28日　15:40　～　19:00
試験場所	鳥取県生活環境部衛生環境研究所　第5微生物室
試験時室内温度	24 ℃
使用した市販標準品	物質名　：フルトラニル　試薬会社名：和光純薬工業（株） 製品番号：068-02023　　ロット番号：YPH8125
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2001（和光純薬工業（株）製）
試験機関担当者	鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室　研究員　金田聡子

② 試験操作

フルトラニルを用いて，10％メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液（0,1,2,4,8μg/L）を調製した。調整した試験用試料溶液を用いて､各調整濃度につき3重測定を行い,3個の吸光度それぞれから求めた測定濃度より,平均,標準偏差,変動係数を求めた。

(2)　検出下限及び定量下限

①　試験条件

本製品の検出下限及び定量下限における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.2 検出下限及び定量下限の試験条件

項　目	内　容
実証項目	基本的な性能・検出下限及び定量下限（標準試料試験）
対象物質	フルトラニル
対象製品名	フルトラニル測定キットＥ
製品番号	ロット番号　E-FLN　001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 21 日
測定範囲（製品仕様）	1 ～ 8 μｇ/L
試験日時	平成 17 年 10 月 31 日　9:00　～　11:45
試験場所	鳥取県生活環境部衛生環境研究所　第 5 微生物室
試験時室内温度	22　℃
使用した市販標準品	物質名　：フルトラニル　試薬会社名：和光純薬工業（株） 製品番号：068-02023　　ロット番号：YPH8125
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2001（和光純薬工業（株）製）
試験機関担当者	鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室　研究員　金田聡子

②　試験操作

検出下限1

フルトラニルを用いて、10％メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液（1μg/L：測定範囲の下限付近濃度）を調製した。調製した試験用試料溶液を 3 重測定で 8 回測定し、3 重測定の平均吸光度から算出した 8 個の測定濃度より標準偏差（SD）を求めた。この値から得られた 3SD および 10SD をそれぞれ検出下限および定量下限とした。

検出下限 2

指定濃度系列 0 濃度の吸光度を 10 回測定し，その標準偏差（SD）から得られた 3SD 値（吸光度）を 0 濃度の平均吸光度から差し引いた吸光度から求めた濃度を検出下限とした。

(3)　繰返し再現性

①　試験条件

本製品の繰返し再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.3 繰返し再現性の試験条件

項　目	内　容
実証項目	基本的な性能・繰返し再現性（標準試料試験）
対象物質	フルトラニル
対象製品名	フルトラニル測定キットE
製品番号	ロット番号　E-FLN　001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 21 日
測定範囲（製品仕様）	1 ～ 8 μg/L
試験日時	平成 17 年 10 月 31 日　9:00　～　12:15
試験場所	鳥取県生活環境部衛生環境研究所　第 5 微生物室
試験時室内温度	22 ℃
使用した市販標準品	物質名　：フルトラニル　試薬会社名：和光純薬工業（株） 製品番号：068-02023　　ロット番号：YPH8125
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2001（和光純薬工業（株）製）
試験機関担当者	鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室　研究員　金田聡子

②　試験操作

フルトラニルを用い、10%メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液（2 μg/L：測定範囲の直線付近濃度）を調製した。調製した試験用試料溶液を3 重測定で8 回測定し、得られた8 個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求めた。求めた変動係数から、繰り返し再現性について検討した。

(4)　日間再現性

①　試験条件

本製品の日間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.4　日間再現性の試験条件

項　目	内　　容
実証項目	基本的な性能・日間再現性（標準試料試験）
対象物質	フルトラニル
対象製品名	フルトラニル測定キットＥ
製品番号	ロット番号：E-FLN　001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 21 日
測定範囲（製品仕様）	1 ～ 8 μｇ/L
試験日時	平成 17 年 10 月 28 日　15:40　～　19:00 平成 17 年 10 月 30 日　 9:20　～　11:45 平成 17 年 11 月 1 日　10:00　～　12:30
試験場所	鳥取県生活環境部衛生環境研究所　第 5 微生物室
試験時室内温度	10 月 28 日　24　℃ 10 月 30 日　22　℃ 11 月 1 日　22　℃
使用した市販標準品	物質名　：フルトラニル　試薬会社名：和光純薬工業（株） 製品番号：068-02023　　ロット番号：YPH8125
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2001（和光純薬工業（株）製）
試験機関担当者	鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室　研究員　金田聡子

②　試験操作

同一測定者が 1 週間の異なる 3 日間において、同一ロットの異なるプレートを用いて、「(1)　測定範囲」と同じ測定操作を行った。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、3 日間の比較から日間再現性について検討した。

(5) 期間再現性

① 試験条件

本製品の期間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.5 期間再現性の試験条件

項　目	内　　容
実証項目	基本的な性能・期間再現性（標準試料試験）
対象物質	フルトラニル
対象製品名	フルトラニル測定キットＥ
製品番号	ロット番号　E-FLN　001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 21 日
測定範囲（製品仕様）	1 ～ 8 μｇ/L
試験日時	平成 17 年 10 月 30 日　　9:20　～　11:45 平成 17 年 11 月 30 日　　8:50　～　13:00
試験場所	鳥取県生活環境部衛生環境研究所　第 5 微生物室
試験時室内温度	10 月 30 日　22　℃ 11 月 30 日　19　℃
使用した市販標準品	物質名　：フルトラニル　試薬会社名：和光純薬工業（株） 製品番号：068-02023　　ロット番号：YPH8125
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2001（和光純薬工業（株）製）
試験機関担当者	鳥取県生活環境部衛生環境研究所 　保健衛生室　研究員　金田聡子

② 試験操作

同一ロットの２プレートを用意し，１プレートで「（1）測定範囲」と同じ検討を行った後,冷蔵等指定の方法で保存した１プレートで概ね１ヵ月後に同じ操作を行った。各測定結果（ＯＤ値）からの換算値（濃度）の変動係数を求め、期間を隔てての再現性について検討した。

(6)　プレート間再現性

①　試験条件

本製品のプレート間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.6　プレート再現性の試験条件

項　目	内　　容
実証項目	基本的な性能・プレート間再現性（標準試料試験）
対象物質	フルトラニル
対象製品名	フルトラニル測定キットＥ
製品番号	ロット番号　E-FLN　001F、E-FLN　002F
製造年月日	E-FLN　001F　平成 17 年 9 月 21 日 E-FLN　002F　平成 17 年 10 月 5 日
測定範囲（製品仕様）	1 ～ 8 μｇ/L
試験日時	平成 17 年 11 月 2 日　8:50　～　15:30
試験場所	鳥取県生活環境部衛生環境研究所　第 5 微生物室
試験時室内温度	22　℃
使用した市販標準品	物質名　：フルトラニル　試薬会社名：和光純薬工業（株） 製品番号：068-02023　　ロット番号：YPH8125
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2001（和光純薬工業（株）製）
試験機関担当者	鳥取県生活環境部衛生環境研究所 　保健衛生室　研究員　金田聡子

②　プレート間再現性

同一ロット 2 プレート及び異なるロット 1 プレートの 3 プレートを用いて、同日に「（１）測定範囲」と同じ測定操作を行った。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、同一ロット及び異なるロットの比較からプレート間再現性について検討した。

(7)　交差反応性

①　試験条件

本製品の交差反応性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.7　交差反応性の試験条件

項　目	内　　容
実証項目	基本的な性能・交差反応性（標準試料試験）
対象物質	フルトラニル
対象製品名	フルトラニル測定キットＥ
製品番号	ロット番号：E-FLN　001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 21 日
測定範囲（製品仕様）	1 ～ 8 μｇ/L
試験日時	平成 17 年 11 月 7 日　14:50～18:20
試験場所	鳥取県生活環境部衛生環境研究所　第 5 微生物室
試験時室内温度	23　℃
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2001（和光純薬工業（株）製）
試験機関担当者	鳥取県生活環境部衛生環境研究所 　保健衛生室　研究員　金田聡子

表4.2.8 使用した市販標準品

<table>
<tr><th colspan="2">物質名（標準品）</th><th>試薬会社名</th><th>規格</th><th>含量</th><th>製品番号</th><th>ロット番号</th></tr>
<tr><td>対象物質</td><td>フルトラニル</td><td>和光純薬工業㈱</td><td>残留農薬試験用</td><td>99.0%</td><td>068-02023</td><td>YPH8125</td></tr>
<tr><td rowspan="2">類似物質</td><td>メプロニル</td><td>和光純薬工業㈱</td><td>残留農薬試験用</td><td>99.0%</td><td>133-07903</td><td>YPK9647</td></tr>
<tr><td>ｵｷｼｶﾙﾎﾞｷｼﾝ</td><td>ｱｷｭｳｽﾀﾝﾀﾞｰﾄﾞ</td><td>残留農薬試験用</td><td>98.0%</td><td>P-391N</td><td>0560</td></tr>
</table>

表4.2.9 試験用試料溶液

試験項目	物質名	試料溶液調製濃度
⑦交差反応性	メプロニル オキシカルボキシン	0,0.1,1,10,100　μg/L 0,4,10,25,60 mg/L

②　試験操作

フルトラニル及び類似物質について調製した試料溶液で吸光度曲線（実測値は 3 重測定の平均値から求めた）を描き、吸光度曲線から類似物質の 50%発色阻害濃度を求めた。(フルトラニルの 50%発色阻害濃度/類似物質の 50%発色阻害濃度）×100（%）で交差率を求めた。類似物質を調節した濃度範囲内で 50%発色阻害濃度が求められなかった場合には、より低い発色阻害濃度から交差率を求めた。

4.3 実用的な性能

(1) 回収特性

① 試験条件

本製品の回収特性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.1 回収特性の試験条件

項　目	内　　容
実証項目	実用的な性能・回収特性（模擬環境試料試験）
対象物質	フルトラニル
対象製品名	フルトラニル測定キットE
製品番号	ロット番号　E-FLN　001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 21 日
測定範囲（製品仕様）	1 ～ 8 μg/L
試験日時	平成 17 年 11 月 29 日　9:00～14:00
試験場所	鳥取県生活環境部衛生環境研究所
試験時室内温度	20　℃
使用した市販標準品	物質名　：フルトラニル　試薬会社名：和光純薬工業㈱ 製品番号：068-02023　　　ロット番号：YPH8125
使用した市販標準品	物質名：フミン酸ナトリウム　試薬会社名：アクロス 製品番号：120860050　　　　ロット番号：A0207160001
検量線用ソフト名	LS-PLATE manager 2001（和光純薬工業（株）製）
試験機関担当者	鳥取県生活環境部衛生環境研究所 　保健衛生室　研究員　金田聡子

表 4.3.2 使用した河川水

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
S1	福光橋（国府川）	平成 17 年 11 月 28 日	5L	pH 7.2 COD 2.0mg/L

② 試験操作

グラスファイバーフィルター（GFC：孔径 1.2μm）を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに測定範囲の中央付近となるようにフルトラニルを添加(2μg/L)するとともに、環境試料を想定した妨害物質としてフミン酸ナトリウムを添加(0,1, 5, 10, 50 mg/L) して、試験用試料溶液を調製した。なお、フミン酸ナトリウムは、含量 50～60%の表示であったことから、平均含量 55%として試料の調製を行った。調製した試験用試料溶液について、3 重測定した実測濃度から回収率を求め、フミン酸ナトリウムに対する製品の回収特性を検討した。

(2)　測定精度等

①　試験条件

本製品の測定精度等における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.3　測定精度の試験条件

項　目	内　　容
実証項目	実用的な性能・測定精度（模擬環境試料試験）
対象物質	フルトラニル
対象製品名	フルトラニル測定キットE
製品番号	ロット番号　E-FLN　001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 21 日
測定範囲（製品仕様）	1 ～ 8 μg/L
試験日時	平成 17 年 12 月 12 日　17:30　～　21:00 平成 17 年 12 月 13 日　18:00　～　22:00
試験場所	鳥取県生活環境部衛生環境研究所
試験時室内温度	12 月 12 日　21　℃ 12 月 13 日　21　℃
検量線用ソフト名	LS-PLATE manager 2001（和光純薬工業（株）製）
試験機関担当者	鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室　研究員　金田聡子

表 4.3.4　使用した環境試料

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
S2	福光橋（国府川）	平成 17 年 12 月 9 日	9L	pH 7.4 COD 1.5mgO/L
S3	宮川町（玉川）	平成 17 年 12 月 9 日	9L	pH 6.7 COD 2.4mgO/L
S4	堺町（鉢屋川）	平成 17 年 12 月 9 日	9L	pH 7.0 COD 10.0mgO/L

②　試験操作

複数の河川地点から得られた河川水のろ過原水について，キットが指定または推奨する前処理法で処理し，対象物質を測定する。前処理法が指定または推奨されていない場合には，原水をそのまま測定し，同一試料について，所定の分析方法に従って機器分析を行なった。

また、原水に適当な低濃度でフルトラニルを添加し，添加試料水について ELISA キットの測定（前処理・濃縮を含む）および機器分析をおこなった。

5. 試験結果

5.1 基本的な性能

(1) 測定範囲

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	－	1.726	1.314	1.021	0.659	0.348
	2	－	1.622	1.235	0.992	0.607	0.337
	3	－	1.614	1.307	0.980	0.590	0.317

表 5.1.2 採用した回帰式係数[Y=D+（A−D）／（1+（X／C）^B）]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.653	1.269	2.744	−0.008	0.995

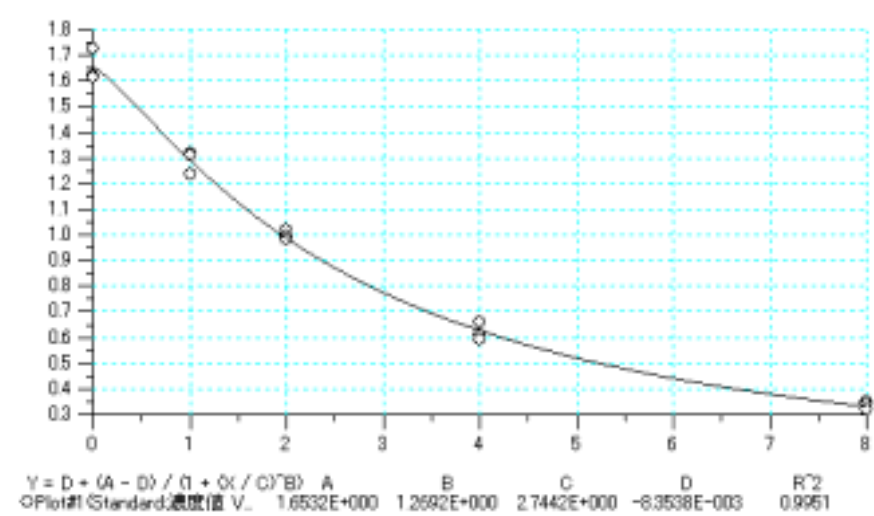



図 5.1.1 検量線

② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.3 対象物質試料溶液の測定データ

<table>
<tr><th colspan="3" rowspan="2">項目</th><th rowspan="2">単位</th><th colspan="5">試験用試料溶液</th></tr>
<tr><th>溶液 S1</th><th>溶液 S2</th><th>溶液 S3</th><th>溶液 S4</th><th>溶液 S5</th></tr>
<tr><td colspan="3">調製濃度</td><td>μg/L</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>8</td></tr>
<tr><td colspan="3">実測回数</td><td>回</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td></tr>
<tr><td rowspan="5">ELISA
実測</td><td rowspan="4">吸光度</td><td>1</td><td>－</td><td>1.642</td><td>1.331</td><td>1.029</td><td>0.665</td><td>0.327</td></tr>
<tr><td>2</td><td>－</td><td>1.538</td><td>1.302</td><td>0.973</td><td>0.646</td><td>0.326</td></tr>
<tr><td>3</td><td>－</td><td>1.550</td><td>1.293</td><td>0.957</td><td>0.652</td><td>0.334</td></tr>
<tr><td>平均</td><td>－</td><td>1.577</td><td>1.309</td><td>0.986</td><td>0.654</td><td>0.329</td></tr>
<tr><td colspan="2">換算値</td><td>μg/L</td><td>－</td><td>0.953</td><td>2.004</td><td>3.790</td><td>8.053</td></tr>
<tr><td colspan="3">標準偏差</td><td>μg/L</td><td>－</td><td>0.055</td><td>0.148</td><td>0.073</td><td>0.102</td></tr>
<tr><td colspan="3">変動係数</td><td>%</td><td>－</td><td>5.8</td><td>7.4</td><td>1.9</td><td>1.3</td></tr>
<tr><td colspan="3">相対値**</td><td>%</td><td>－</td><td>95</td><td>100</td><td>95</td><td>101</td></tr>
</table>

** 調整濃度を 100%としたときの各実測濃度（3 重測定の平均値）との割合（%）

(2) 検出下限及び定量下限

① 検量線の作成

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.4 検量線用標準溶液の測定データ

<table>
<tr><th colspan="2" rowspan="2">項目</th><th rowspan="2">単位</th><th colspan="5">検量線用標準溶液</th></tr>
<tr><th>ﾌﾞﾗﾝｸ</th><th>STD1</th><th>STD2</th><th>STD3</th><th>STD4</th></tr>
<tr><td colspan="2">所定濃度</td><td>μg/L</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>8</td></tr>
<tr><td colspan="2">実測回数</td><td>回</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td></tr>
<tr><td rowspan="3">ELISA
実測
（吸光度）</td><td>1</td><td>－</td><td>1.713</td><td>1.240</td><td>0.957</td><td>0.556</td><td>0.296</td></tr>
<tr><td>2</td><td>－</td><td>1.597</td><td>1.208</td><td>0.932</td><td>0.576</td><td>0.294</td></tr>
<tr><td>3</td><td>－</td><td>1.573</td><td>1.245</td><td>0.951</td><td>0.558</td><td>0.282</td></tr>
</table>

表 5.1.5 採用した回帰式係数[Y=D＋（A−D）／（1＋（X／C）^B）]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.627	1.242	2.642	−0.051	0.996

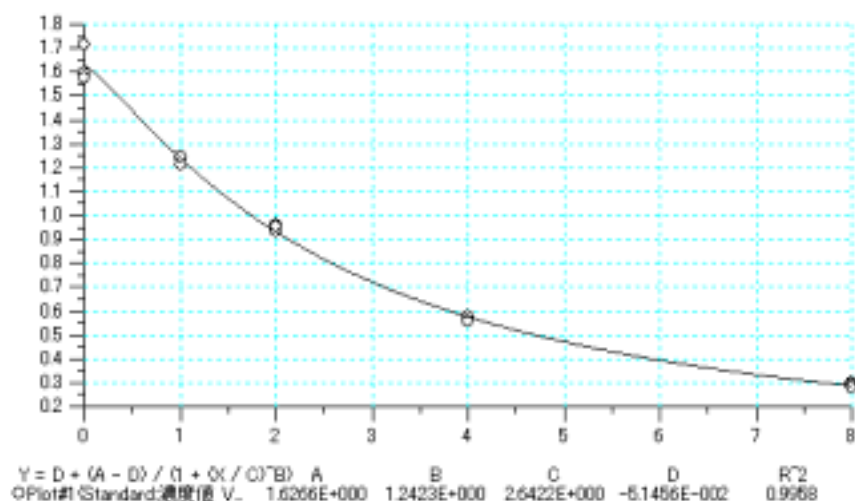



図 5.1.2 検量線

②　試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.6.1　対象物質試料溶液の測定データ（検出下限１）

項目			単位	試験用試料溶液							
				溶液S2							
調製濃度			μg/L	1	1	1	1	1	1	1	1
実測回数			回	1	2	3	4	5	6	7	8
ELISA実測	吸光度	1	―	1.223	1.228	1.215	1.194	1.177	1.223	1.173	1.178
		2	―	1.212	1.201	1.198	1.226	1.149	1.161	1.205	1.163
		3	―	1.218	1.223	1.210	1.195	1.219	1.221	1.192	1.209
		平均	―	1.218	1.223	1.210	1.195	1.219	1.221	1.192	1.209
	換算値		μg/L	1.061	1.062	1.089	1.096	1.163	1.107	1.139	1.158
標準偏差			μg/L	0.040							

検出下限（3SD）　＝　0.12μg/L　定量下限（10SD）＝　0.40μg/L

表 5.1.6.2　対象物質試料溶液の測定データ（検出下限２）

項目	単位	試験用試料溶液									
		溶液S1									
調製濃度	μg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
実測回数	回	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ELISA実測（吸光度）	―	1.571	1.538	1.624	1.573	1.461	1.473	1.581	1.418	1.520	1.478
吸光度平均	―	1.524									
標準偏差	μg/L	0.065									

吸光度の平均－３SD＝　1.524－0.195　＝　1.329
回帰式より
検出下限２　　　＝　0.77　μg/L

(3) 繰返し再現性

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.7 検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA実測（吸光度）	1	—	1.706	1.207	0.914	0.552	0.310
	2	—	1.510	1.103	0.868	0.542	0.283
	3	—	1.503	1.223	0.925	0.567	0.309

表 5.1.8 採用した回帰式係数[Y=D＋（A−D）／（1＋（X／C）^B）]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.572	1.213	2.542	−0.019	0.988

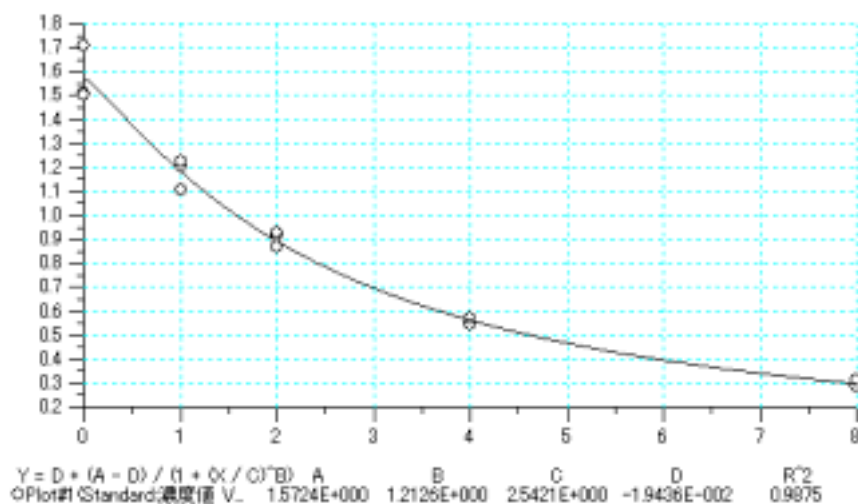



図 5.1.3 検量線

② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.9 対象物質試料溶液の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液							
				溶液S2							
調製濃度			μg/L	2	2	2	2	2	2	2	2
実測回数			回	1	2	3	4	5	6	7	8
ELISA実測	吸光度	1	—	0.910	0.894	0.891	0.935	0.875	0.878	0.865	0.957
		2	—	0.881	0.896	0.910	0.906	0.859	0.936	0.930	0.923
		3	—	0.919	0.910	0.944	0.951	0.941	0.967	0.949	0.988
		平均	—	0.903	0.900	0.915	0.931	0.892	0.927	0.915	0.956
	換算値		μg/L	1.950	1.963	1.902	1.839	2.002	1.857	1.907	1.742
平均			μg/L	1.895							
標準偏差			μg/L	0.082							
変動係数			%	4.3							

(4) 日間再現性

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.10.1 検量線用標準溶液の測定データ（1 日目）

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	—	1.726	1.314	1.021	0.659	0.348
	2	—	1.622	1.235	0.992	0.607	0.337
	3	—	1.614	1.307	0.980	0.590	0.317

表 5.1.10.2 採用した回帰式係数[Y=D+（A−D）／（1+（X／C）^B）]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.653	1.269	2.744	−0.008	0.995

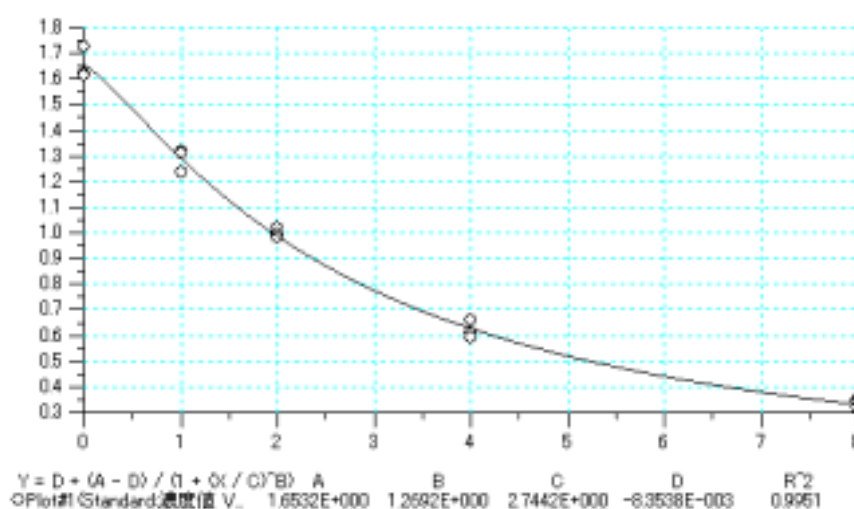



図 5.1.4.1 検量線

表 5.1.11.1 検量線用標準溶液の測定データ（3 日目）

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	—	1.760	1.276	0.881	0.540	0.323
	2	—	1.675	1.178	0.865	0.555	0.297
	3	—	1.577	1.212	0.943	0.565	0.320

表 5.1.11.2 採用した回帰式係数[Y=D+（A−D）／（1+（X／C）^B）]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.671	1.276	2.076	0.073	0.993

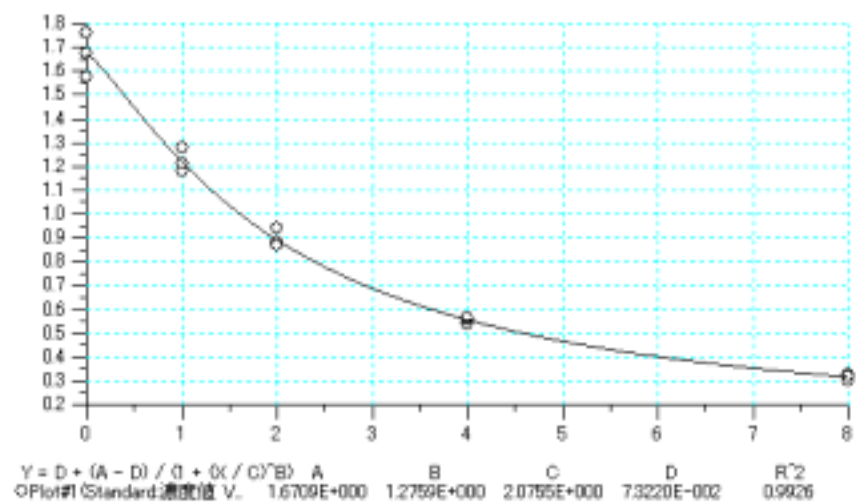



図 5.1.4.2 検量線

表 5.1.12.1　検量線用標準溶液の測定データ（5 日目）

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	－	1.551	1.175	0.824	0.531	0.291
	2	－	1.469	1.183	0.883	0.554	0.281
	3	－	1.462	1.162	0.85	0.539	0.287

表 5.1.12.2　採用した回帰式係数[Y=D+（A−D）／（1+（X／C）^B）]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.495	1.404	2.348	0.074	0.997

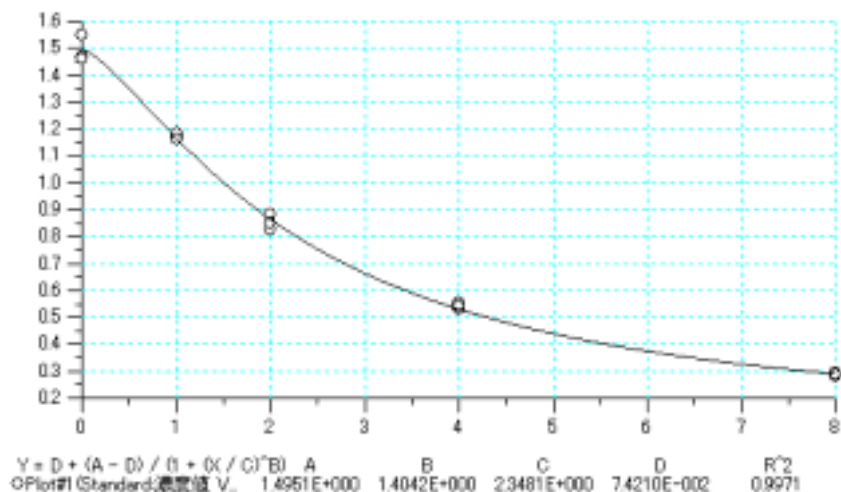



図 5.1.4.3 検量線

② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.13 対象物質試料溶液の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液														
				溶液 S1			溶液 S2			溶液 S3			溶液 S4			溶液 S5		
				1日	3日	5日	1日	3日	5日	1日	3日	5日	1日	3日	5日	1日	3日	5日
調製濃度			μg/L	0	0	0	1	1	1	2	2	2	4	4	4	8	8	8
実測回数			回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ELISA実測	吸光度	1	－	1.642	1.585	1.352	1.331	1.214	1.060	1.029	0.884	0.849	0.665	0.546	0.522	0.327	0.284	0.282
		2	－	1.538	1.608	1.461	1.302	1.228	1.235	0.973	0.879	0.886	0.646	0.525	0.51	0.326	0.274	0.279
		3	－	1.55	1.596	1.437	1.293	1.193	1.115	0.957	0.911	0.862	0.652	0.551	0.562	0.334	0.273	0.291
		平均	－	1.577	1.596	1.417	1.309	1.212	1.137	0.986	0.891	0.866	0.654	0.541	0.531	0.329	0.277	0.284
	換算値		μg/L	－	－	－	0.953	1.018	1.09	2.004	1.998	1.997	3.79	4.145	4.005	8.053	9.358	8.198
平均			μg/L	－			1.020			2.000			3.980			8.536		
標準偏差			μg/L	－			0.069			0.004			0.179			0.715		
変動係数			%	－			6.7			0.2			4.5			8.4		

(5) 期間再現性

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表5.1.14.1 検量線用標準溶液の測定データ（０ヶ月）

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA実測（吸光度）	1	－	1.760	1.276	0.881	0.540	0.323
	2	－	1.675	1.178	0.865	0.555	0.297
	3	－	1.577	1.212	0.943	0.565	0.320

表5.1.14.2 採用した回帰式係数[Y＝D＋（A－D）／（１＋（X／C）^B）]（０ヶ月）

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.671	1.276	2.076	0.073	0.993

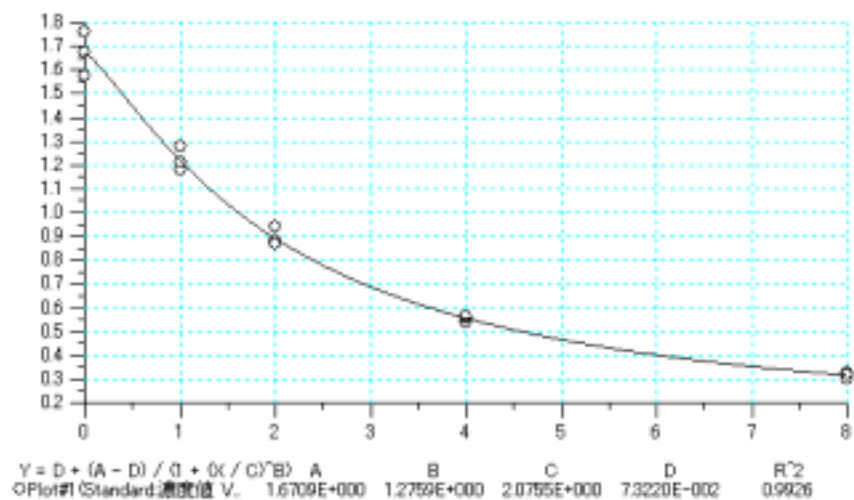



図 5.1.5.1　検量線（0ヶ月）

表5.1.15.1　検量線用標準溶液の測定データ（1ヶ月）

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	―	1.277	0.971	0.751	0.417	0.229
	2	―	1.230	0.94	0.724	0.450	0.212
	3	―	1.167	0.977	0.705	0.437	0.219

表5.1.15.2　採用した回帰式係数[Y=D+（A−D）／（1+（X／C）^B）]（1ヶ月）

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.224	1.376	2.589	0.006	0.996

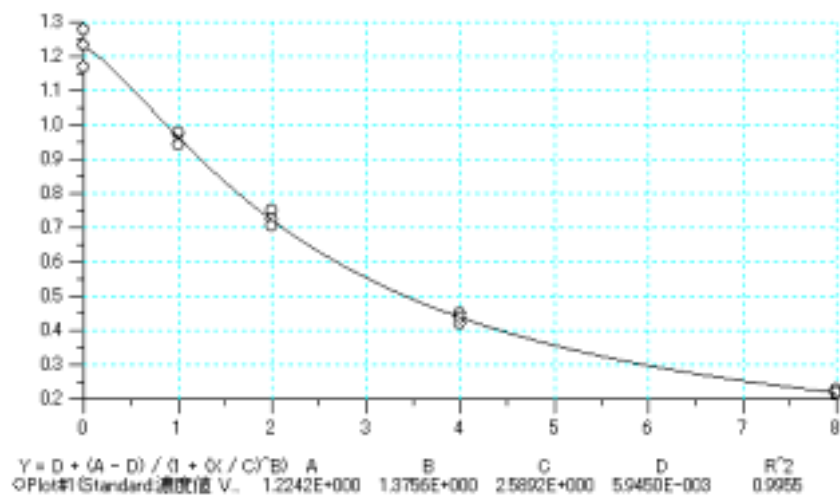



図 5.1.5.2　検量線（1ヶ月）

②　試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.16 対象物質試料溶液の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液									
				溶液 S1		溶液 S2		溶液 S3		溶液 S4		溶液 S5	
				0	1ヶ月	0	1ヶ月	0	1ヶ月	0	1ヶ月	0	1ヶ月
調製濃度			μg/L	0	0	1	1	2	2	4	4	8	8
実測回数			回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ELISA実測	吸光度	1	－	1.585	1.152	1.214	0.917	0.884	0.717	0.546	0.404	0.284	0.213
		2	－	1.608	1.186	1.228	0.958	0.879	0.702	0.525	0.454	0.274	0.206
		3	－	1.596	1.241	1.193	0.976	0.911	0.700	0.551	0.441	0.273	0.211
		平均	－	1.596	1.193	1.212	0.950	0.891	0.706	0.541	0.433	0.277	0.210
	換算値		μg/L	―	―	1.018	1.054	1.998	2.079	4.145	4.063	9.358	8.308
標準偏差			μg/L	―	―	0.043	0.110	0.067	0.046	0.137	0.282	0.247	0.129
変動係数			%	―	―	4.3	10.4	3.4	2.2	3.3	6.9	2.6	1.5

(6)　プレート間再現性

①　検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.17.1　検量線用標準溶液の測定データ(プレート A)

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA実測（吸光度）	1	―	1.616	1.238	1.001	0.604	0.296
	2	―	1.601	1.215	0.913	0.562	0.279
	3	―	1.610	1.237	0.929	0.580	0.297

表 5.1.17.2　採用した回帰式係数[Y＝D＋（A－D）／（1＋（X／C）^B）]（プレート A）

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.608	1.205	2.872	－0.096	0.998

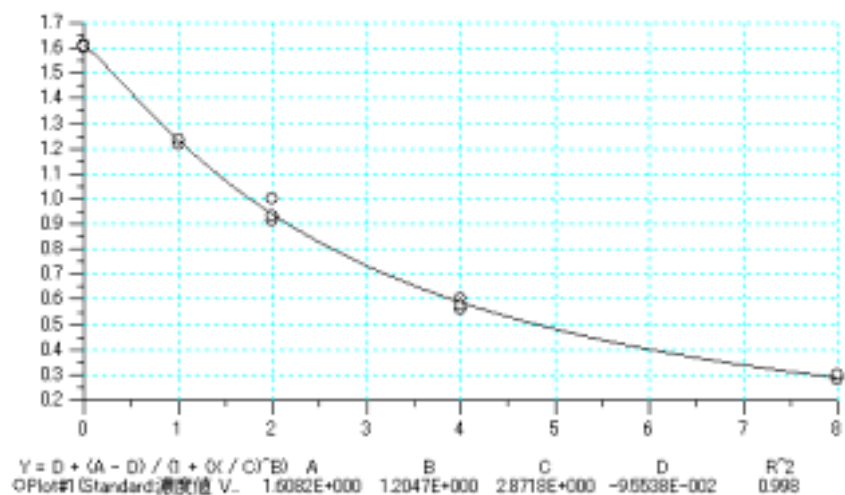



図 5.1.6.1　検量線（プレート A）

表 5.1.18.1　検量線用標準溶液の測定データ(プレート B)

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA	1	―	1.496	1.206	0.933	0.612	0.314
実測	2	―	1.518	1.164	0.898	0.589	0.299
(吸光度)	3	―	1.450	1.144	0.901	0.592	0.322

表 5.1.18.2　採用した回帰式係数[Y=D+（A−D）／（1＋（X／C）^B）]（プレート B）

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.488	1.186	3.162	−0.079	0.998

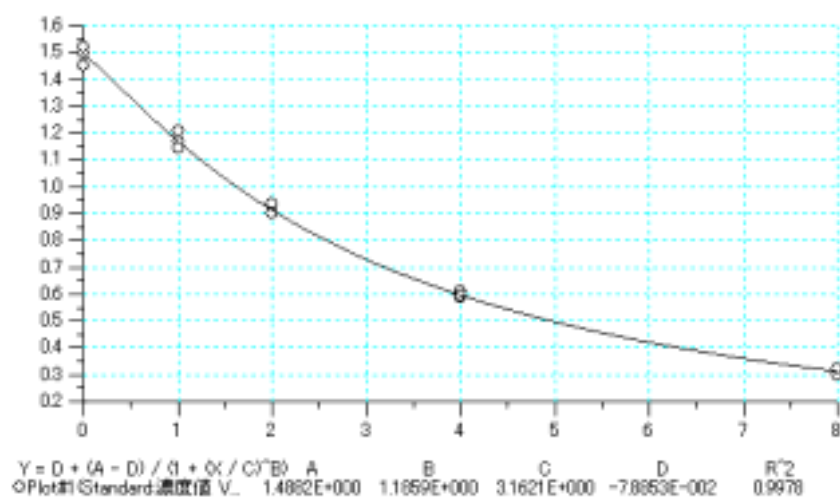



図 5.1.6.2　検量線（プレート B）

表 5.1.19.1　検量線用標準溶液の測定データ(プレートC)

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA実測（吸光度）	1	―	1.648	1.320	1.011	0.581	0.305
	2	―	1.644	1.276	0.969	0.577	0.301
	3	―	1.596	1.240	0.984	0.593	0.309

表 5.1.19.2　採用した回帰式係数[Y=D+（A−D）／（1＋（X／C）^B）]（プレートC）

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.628	1.362	2.660	−0.005	0.998

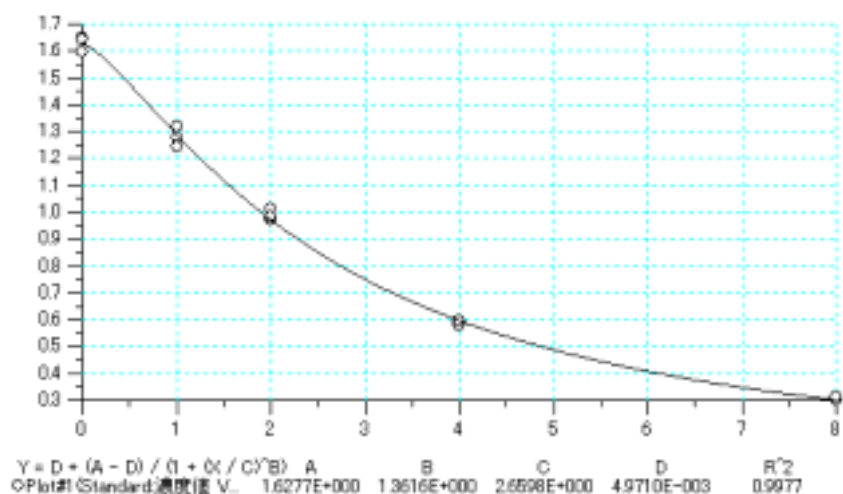



図 5.1.6.3　検量線（プレートC）

②　試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.20 対象物質試料溶液の測定データ

項目			単位	溶液S1 プレートA	溶液S1 プレートB	溶液S1 プレートC	溶液S2 プレートA	溶液S2 プレートB	溶液S2 プレートC	溶液S3 プレートA	溶液S3 プレートB	溶液S3 プレートC	溶液S4 プレートA	溶液S4 プレートB	溶液S4 プレートC	溶液S5 プレートA	溶液S5 プレートB	溶液S5 プレートC
調製濃度			μg/L	0	0	0	1	1	1	2	2	2	4	4	4	8	8	8
実測回数			回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ELISA実測	吸光度	1	―	1.514	1.400	1.526	1.184	1.139	1.239	0.905	0.908	0.918	0.536	0.559	0.552	0.287	0.286	0.297
		2	―	1.489	1.450	1.543	1.147	1.155	1.222	0.843	0.891	0.89	0.494	0.543	0.535	0.261	0.284	0.273
		3	―	1.554	1.584	1.571	1.256	1.223	1.281	0.826	0.859	0.834	0.506	0.563	0.539	0.254	0.286	0.279
		平均	―	1.519	1.478	1.547	1.196	1.172	1.247	0.858	0.886	0.881	0.512	0.555	0.542	0.267	0.285	0.283
	換算値		μg/L	―	―	―	1.117	0.993	1.115	2.358	2.127	2.370	4.692	4.383	4.458	8.511	8.660	8.464
標準偏差			μg/L	―			0.071			0.137			0.161			0.102		
変動係数			%	―			6.6			6.0			3.6			1.2		

*A,C:同一ロット、B:異なるロット

(7) 交差反応性

① 検量線作成記録(フルトラニル)

表 5.1.21.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA	1	—	1.809	1.352	0.976	0.588	0.307
実測	2	—	1.688	1.300	0.908	0.584	0.295
(吸光度)	3	—	1.639	1.320	0.967	0.593	0.311

表 5.1.21.2 採用した回帰式係数[Y=D+(A−D)/(1+(X/C)^B)]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.715	1.322	2.387	0.019	0.994

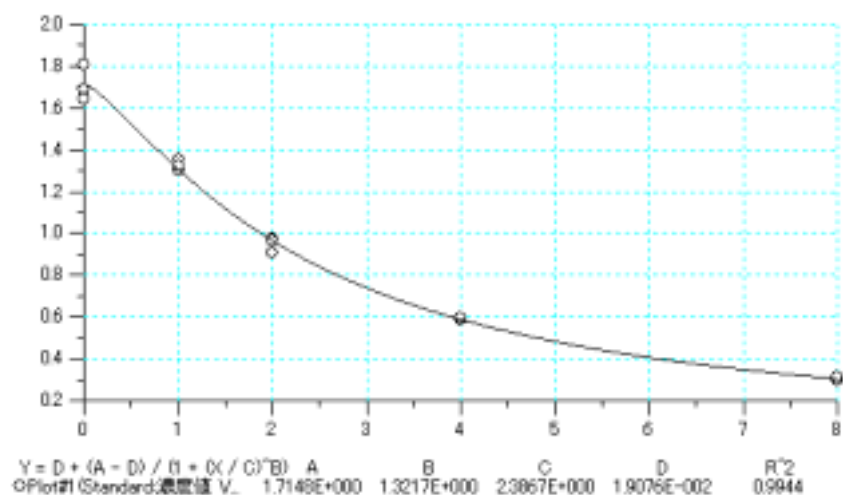



図 5.1.6.3 検量線

② 試験結果記録

表 5.1.22.1 対象物質の交差反応率

	フルトラニル	メプロニル	オキシカルボキシン
50%阻害濃度(μg/L)	2.43	6.62	>60000
交差率 (%)	100	36.6	<0.1

表 5.1.22.2 フルトラニルの測定データ

項目		単位	ﾌﾞﾗﾝｸ	溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4
調整濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA	1	—	1.612	1.277	0.953	0.571	0.308
実測	2	—	1.658	1.270	0.932	0.572	0.282
(吸光度)	3	—	1.694	1.250	0.932	0.584	0.297

表 5.1.22.3　メプロニルの測定データ

項目		単位	ﾌﾞﾗﾝｸ	溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4
調整濃度		μg/L	0	0.1	1	10	100
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA	1	－	1.510	1.518	1.341	0.591	0.092
実測	2	－	1.643	1.588	1.351	0.614	0.090
(吸光度)	3	－	1.578	1.492	1.331	0.583	0.093

表 5.1.22.4 オキシカルボキシンの測定データ

項目		単位	ﾌﾞﾗﾝｸ	溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4
調整濃度		μg/L	0	4000	10000	25000	60000
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA	1	－	1.539	1.492	1.445	1.400	1.380
実測	2	－	1.527	1.494	1.486	1.506	1.368
(吸光度)	3	－	1.557	1.602	1.437	1.432	1.392

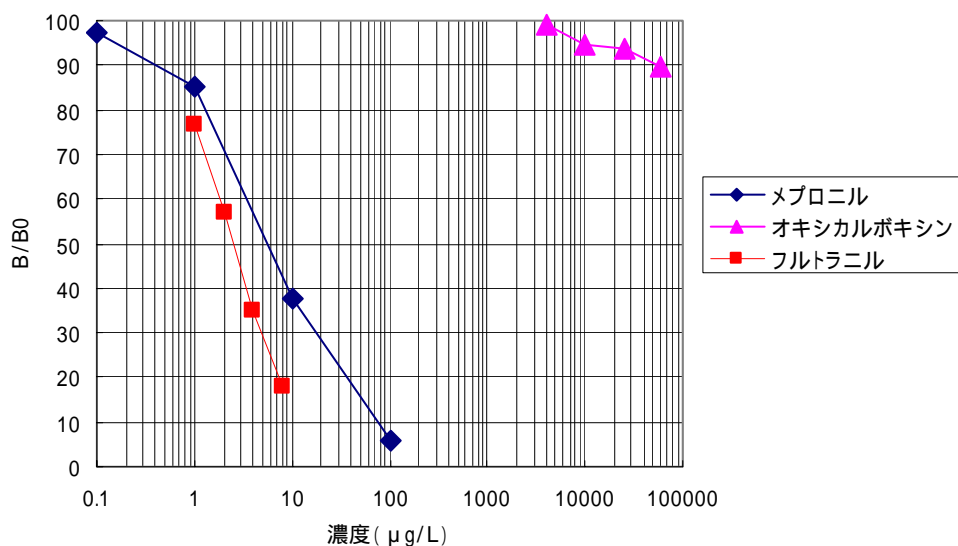



図 5.1.7　交差反応性試験結果

5.2　実用的な性能

(1)　回収特性

①　検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.2.1　検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA	1	－	1.435	1.084	0.820	0.459	0.242
実測	2	－	1.336	1.039	0.771	0.461	0.234
(吸光度)	3	－	1.320	1.014	0.758	0.452	0.230

表 5.2.2　採用した回帰式係数[Y＝D＋（A－D）／（1＋（X／C）^B）]

回帰式の係数	A	B	C	D	R＾2
値	1.363	1.3583	2.416	0.012	0.995

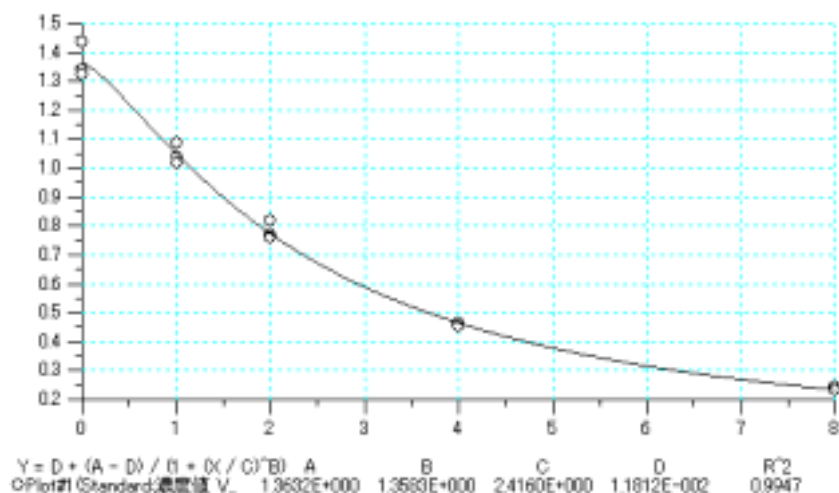



図 5.2.1　検量線

②　試験結果

河川水に測定範囲の中央付近（終濃度：2μg/L）のフルトラニルを添加し、さらにフミン酸ナトリウムを添加（終濃度：0,1,5,10,50mg/L）した試験用試料溶液の測定結果は、以下のとおりであった。

フミン酸ナトリウム濃度が 50mg/L において、回収率が 146%となり正の妨害が見られたが、この濃度程度までなら実用上支障はないと考えられた。

表 5.2.3 回収特性の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液				
ﾌﾙﾄﾗﾆﾙ添加濃度			μg/L	2	2	2	2	2
ﾌﾐﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑ添加濃度			mg/L	0	1	5	10	50
実測回数			回	3	3	3	3	3
ELISA実測	吸光度	1	－	0.744	0.794	0.733	0.712	0.617
		2	－	0.735	0.742	0.707	0.714	0.602
		3	－	0.710	0.761	0.775	0.729	0.588
		平均	－	0.730	0.766	0.738	0.718	0.602
	換算値		μg/L	2.203	2.036	2.164	2.258	2.910
標準偏差			μg/L	0.086	0.118	0.162	0.046	0.093
変動係数			%	3.9	5.8	7.5	2.0	3.2
回収率			%	110	102	108	113	146

(2) 測定精度等

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.2.4 検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	1	2	4	8
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	―	1.012	0.661	0.545	0.355	0.223
	2	―	0.894	0.674	0.563	0.373	0.222
	3	―	0.851	0.654	0.529	0.368	0.221

表 5.2.5 採用した回帰式係数[Y=D+(A−D)/(1+(X/C)^B)]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	0.919	0.896	3.636	−0.126	0.982

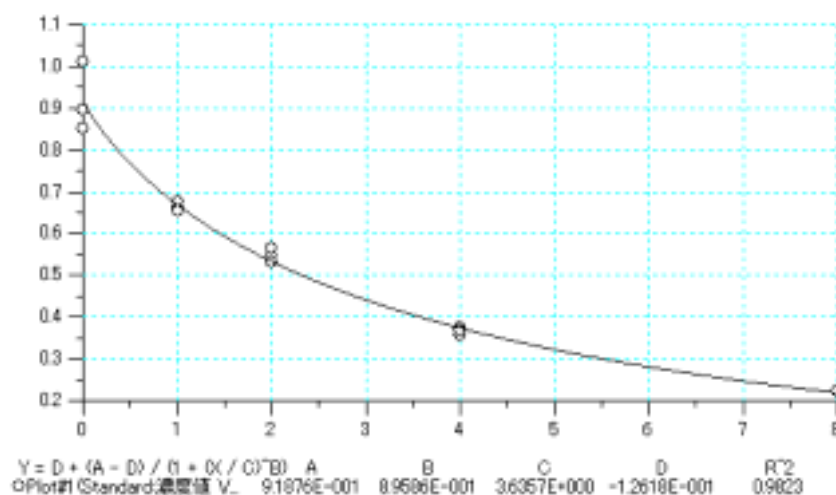



図 5.2.2 検量線

② 試験結果

複数の河川水をELISA法及びGC/MS法により測定したところ､いずれからもフルトラニルは検出されなかった。そこで、これらの河川水にフルトラニルを2μg/Lになるように添加し、両法による測定結果を表5,2,7に示した。変動係数、回収率とも良好な結果が得られた。

表5.2.6 実試料での測定結果

項目			単位	試験用試料溶液		
				福光橋 （国府川）	宮川町 （玉川）	堺町 （鉢屋川）
実測回数			回	3	3	3
ELISA	吸光度	1	―	1.487	1.425	1.379
		2	―	1.427	1.388	1.338
		3	―	1.432	1.397	1.380
		平均	―	1.449	1.403	1.366
	換算値		μg/L			
	標準偏差		μg/L	―	―	―
	変動係数		%	―	―	―
GC/MS	測定値	1	μg/L	ND	ND	ND
		2	μg/L	ND	ND	ND
		3	μg/L	ND	ND	ND
		平均	μg/L	―	―	―
	標準偏差		μg/L	―	―	―
	変動係数		%	―	―	―

濃度単位はμg/L。ELISAの検出下限1は0.12μg/L、検出下限2は0.77μg/L。
GC/MSの検出下限（MDL）は、0.008μg/L。

表5.2.7 添加回収試験結果（フルトラニルが2μg/Lになるよう添加）

項目			単位	試験用試料溶液		
				福光橋 （国府川）	宮川町 （玉川）	堺町 （鉢屋川）
実測回数			回	3	3	3
ELISA	吸光度	1	―	0.888	0.846	0.821
		2	―	0.938	0.830	0.765
		3	―	0.848	0.825	0.774
		平均	―	0.891	0.834	0.787
	換算値		μg/L	1.9	2.2	2.4
	標準偏差		μg/L	0.19	0.05	0.15
	変動係数		%	9.8	2.3	6.3
	回収率		%	96	103	114
GC/MS	測定値	1	μg/L	1.8	2.0	1.8
		2	μg/L	2.0	1.9	2.0
		3	μg/L	1.9	1.8	1.9
		平均	μg/L	1.9	1.9	1.9
	標準偏差		μg/L	0.042	0.042	0.057
	変動係数		%	4.4	4.4	6.0
	回収率		%	96	95	95

濃度単位はμg/L。ELISAの検出下限1は0.12μg/L、検出下限2は0.77μg/L。
GC/MSの検出下限(MDL)は、0.008μg/L

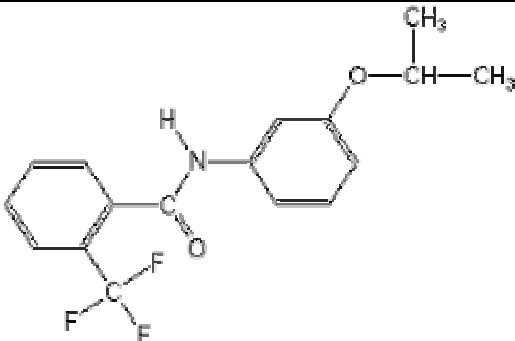
6. 実証試験結果の検討と考察

(1) 製品性能の信頼性

実証試験で実施した基本性能７項目の全ての結果から申請データ（1～8μｇ/L）の濃度範囲においては、十分な製品性能の信頼性を確認した。

(2) 一般環境モニタリングでの実用性

回収特性試験においてフミン酸ナトリウム濃度が50mg/Lのとき回収率が146%となり正の妨害が見られたが、フミン酸ナトリウム 1～10mg/L の範囲では回収率 102～113%と妥当な結果となっており､河川水ろ過水にフルトラニルを添加した実証試験の結果からも水質モニタリング等での実用化が可能であると考えられた。

(3) 製品操作等の簡便性

一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、試料の前処理がない場合、約３時間で測定結果が得られ、同時に約２６試料（３重測定）の測定が可能であり、本試験での GC/MS－SIM 法では、３試料（３重測定）の測定に約３日が必要であることから操作の簡便性は高いといえる。

また、製品に添付された取扱説明書の記述も妥当である。

付録：フルトラニル物性表
付録：実証試験計画書

フルトラニル物性表

実証機関	鳥取県	環境技術開発者	㈱ホリバ・バイオテクノロジー
製品の名称	フルトラニル測定キットE		
測定対象物質名	フルトラニル (Flutolanil)		
略名	Moncut、Contrast, Folistar, NNF-136, Prostar		
化学名	*N*-[3-(1-methylethoxy)phenyl]-2-(trifluoromethyl)benzamide α，α，α-trifluoro-3′-isopropoxy-*o*-toluanilide (IUPAC)		
分子式(分子量)	$C_{17}H_{16}F_3NO_2$ (323.31)	CAS No.	66332-96-5
構造式			
物理化学的性状	外 観*1	無～白色の結晶	
	融 点*2	mp 102-103℃	
	蒸気圧*2	1.77mPa(20℃)	
	比 重*1	1.3	
	ｵｸﾀﾉｰﾙ / 水 分配係数*1	Log Pow = 3.7	
	溶解性*2	水(9.6mg/l 20℃)。ヘキサン 3g/l 、トルエン 65g/l 、クロロホルム 238g/l、 メタノール 606g/l (20℃)、	
用途	殺菌剤, 防かび剤, 防汚剤		
規制等	昭和 60 年に農薬登録。ゴルフ場農薬で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針。公共用水域等における農薬の水質評価指針。		
備考			

*1 国際化学物質安全性カード
*2 農薬データブック第 3 版 (1997) ソフトサイエンス社

計　　　画　　　書

環境技術実証モデル事業

化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術
実証試験計画書

環境技術開発者	株式会社ホリバ・バイオテクノロジー
技術・製品の名称	《技術名》　ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》　フルトラニル測定キットE

平成１７年１０月

鳥　取　県

はじめに

本実証試験計画書は、「化学物質に関する簡易モニタリング技術　実証試験要領第２版（平成１７年５月１６日　環境省総合環境政策局）」（以下、「実証試験要領」という。）に基づいて選定された実証対象技術について、実証機関及び環境技術開発者の２者が協議、合意の上、実証試験要領に準じて策定したものである。

（実証機関）

鳥取県生活環境部衛生環境研究所

所 長　　杉 本 雅 美

（環境技術開発者）

株式会社ホリバ･バイオテクノロジー

代表取締役社長 河 野 猛

目　次

付録０：取扱説明書

付録１：技術仕様書

付録２：自社による性能試験結果

付録３：参考となるその他の文書やデータ等

付録４：品質管理マニュアル

１．実証試験の概要と目的

1.1 実証試験の概要と目的

既に適用可能な段階にありながら、環境保全効果等についての客観的な評価が行われていないために普及が進んでいない先進的環境技術について、その環境保全効果等を第三者が客観的に実証する事業をモデル的に実施することにより､環境技術実証の手法･体制の確立を図るとともに、環境技術の普及を促進し、環境保全と環境産業の発展に資することを目的とするものである。

本実証試験は、平成１７年５月１６日　環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領に基づいて選定された実証対象技術について、同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで、製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

本実証試験の化学物質簡易モニタリング技術とは、操作・管理の容易性や定量の高感度化などの特徴をもったもので、スクリーニング的な活用や簡易な方法で異常値を監視できることなどへの有用性が期待できるものを指すものとする。

対象とする技術は、一般環境モニタリングでの利活用の可能性を念頭に、抗原抗体反応を応用した酵素標識免疫測定法（ＥＬＩＳＡ法）による簡易分析技術とする。

1.2 実証試験の視点

本実証試験では、以下の視点から実証を行うものとする。

○　製品性能の信頼性

○　一般環境モニタリングでの実用性

○　製品操作等の簡便性

２．実証試験参加組織と実証試験参加者の責任分掌

2.1 実証試験参加組織

実証試験に参加する組織は、下表に示すとおりである。

表 2.1　実証試験参加組織

実証機関	団体名	鳥取県生活環境部衛生環境研究所
	住所	〒682-0704　鳥取県東伯郡湯梨浜町南谷526-1
	担当者所属・氏名	食品衛生室　室長　筧　一郎
	電話番号	0858-35-5411
	FAX 番号	0858-35-5413
	E-mail アドレス	kakehii@pref.tottori.jp
環境技術開発者	企業名	株式会社ホリバ・バイオテクノロジー
	住所	〒601-8315　京都市南区吉祥院車道町48番地
	担当者所属・氏名	試薬事業部開発・製造部　伊東　茂壽
	電話番号	075-692-1786
	FAX 番号	075-692-1790
	E-mail アドレス	Shigekazu.ito@horiba.com

2.2 実施体制

実証試験の実施体制は、下図に示すとおりである。

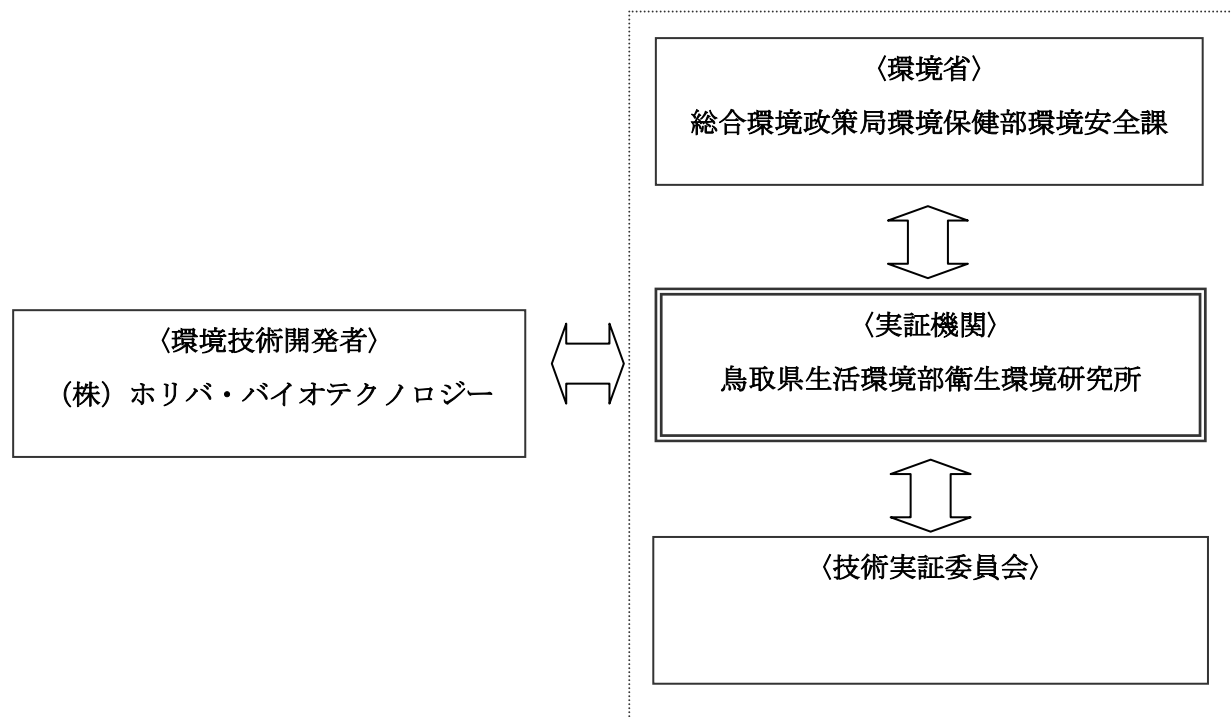



図 2.2　実証試験の実施体制

2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加者とその責任分掌は、下表に示すとおりである。

表 2.3　実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加機関	責任分掌	参加者	
		部署	氏名
実証機関	実証試験の全体の総括責任者	所長	杉本　雅美
	実証試験における ELISA 法の総括責任者	食品衛生室長	筧　　一郎
	実証試験における ELISA 法担当者のリーダー	食品衛生室 研究員	山根　一城
	実証試験における ELISA 法担当者	保健衛生室 研究員	金田　聡子
	実証試験における機器分析の総括責任者	食品衛生室長	筧　　一郎
	実証試験における機器分析担当者のリーダー	食品衛生室 研究員	山根　一城
	実証試験における機器分析担当者	食品衛生室 研究員	池井　和世
	実証試験における機器分析担当者	水環境室 研究員	奥田　益算
	実証試験における品質管理者	技術次長	八幡　正雄
	実証試験における品質管理担当者（内部監査員）	保健衛生室長	井田　正己
	実証試験における品質管理担当者（内部監査員）	環境化学室 特別研究員	牧田　尊弘
環境技術開発者	実証対象製品全体の総括責任者	開発・製造部 部長	伊東　茂壽
	実証対象製品の提供	開発・製造部 次長	門脇　篤
	実証対象製品の取扱説明書等の提供	開発・製造部 部長	伊東　茂壽
	実証試験実施上の参考情報の提供	開発・製造部 次長	門脇　篤

３．実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要

3.1 実証対象技術の原理

この実証対象製品は、フルトラニルに対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境水のフルトラニル測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応（測定対象物質濃度が高い試料では吸光度が低く、濃度が低い試料では吸光度が高い）で、マイクロプレート（96 ウェル）を使用したキットである。

3.2 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

表 3.2　実証対象製品のデータ（1）

項目	記　入　欄
製品名	フルトラニル測定キットＥ
型番	EL105－01
販売・製造元	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
重量（キット一式、g）	350g
価格（円）	99,750 円
分析対象物質	フルトラニル
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（　　）
利用用途	環境水その他の水質モニタリング
標準試薬・種類	付属（調製済／調製要）
操作環境（室温）	常温（15℃～25℃）
製品保管条件	4℃～8℃
製品保証期間	製造後 10 ヶ月間
同時測定数（最多）	46 試料
測定時間	2～3 時間

表 3.2　実証対象製品のデータ（2）

項目	記　入　欄
１．基本的な性能	
①測定範囲	1～8　ppb　（付録１）
②検出下限及び定量下限	
③繰返し再現性	標準偏差：0.16～0.29　変動係数　4.8～6.0　（付録１）
④日間再現性	標準偏差：0.06～0.22　変動係数　1.2～5.4　（付録２）
⑤期間再現性	保存安定性　（付録２）
⑥プレート間再現性	
⑦交差反応性	交差率：30.1%（メプロニル）　（付録２）
⑧その他	
２．実用的な性能	
①回収特性	113～120%（ほうれんそう）　（付録２）
②測定精度等	
③その他	
試験責任者	伊東　茂壽
試験年月日	平成１５年１２月２７日

４．実証試験のデザイン

4.1 実証試験の期間

実証試験の期間は、平成 17 年 10 月中旬～平成 17 年 11 月中旬とする。また、その期間のスケジュール（予定）は、下表に示すとおりである。

表 4.1　実証試験のスケジュール（予定）

	9月	１０月				１１月			１２月	２月	３月
	7日	３日	２週	３週	４週	１週	２週	３週	３週	１週	４週
実証試験計画の策定											
対象技術の選定、計画書案作成	○										
実証試験計画書策定、承認		○									
実証試験の実施											
測定範囲の検討				○							
検出限界及び定量限界の検討				○							
繰返し再現性の検討				○							
日間再現性の検討				○							
期間再現性の検討				○				○			
プレート間再現性の検討				○							
交差反応性の検討					○						
回収特性の検討					○	○					
測定精度の検討						○	○				
監査の実施					○	○	○				
実証試験結果取りまとめ						○	○	○			
実証試験中間報告							○				
技術実証委員会の実施		○					○		○	○	
報告書の提出											○

4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は、表 4.2 のとおりである。

表 4.2 実証項目の内容

項目	内容
１．基本的な性能	
(1)測定範囲	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の変動等に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(2)検出下限及び定量下限	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(3)繰返し再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(4)日間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なる条件（日付）での同一操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(5)期間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて製造後一定期間経過した製品の操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(6)プレート間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なるロットや異なるプレート間での ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(7)交差反応性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて類似物質別の ELISA 測定値の相違等に基づき、交差反応性を実証する。
２．実用的な性能	
(1)回収特性	提出書類の内容、環境試料を模擬し市販標準品で混合調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の比較に基づき、回収特性を実証する。
(2)測定精度	環境試料（濃度未知）を用いた ELISA 測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき、測定精度、前処理妥当性、操作簡便性等による環境試料への適用性を実証する。

4.3 実証対象製品の受け入れと管理

(1) 実証対象製品（ELISA キット）の受け入れ

受領の記録を ELISA キット管理表（様式 4.3）に記入し、以下の事項を確認する。

〇管理表と ELISA キットの品名、数量が一致していること。

〇ELISA キットの搬送が適切に取り扱われていること。

〇ELISA キットに不適合又は疑義を発見したときは、適切な処置をとる。

(2) ELISA キットの管理

〇ELISA キットは、変質しないように、取扱説明書に記載された保管条件で適切に保管・管理する。

〇ELISA キットの分割を行う場合は、汚染や品質低下のない方法で行い、識別番号等必要な表示を行うとともに、分割の年月日その他必要な事項を管理表に記録する。

4.4 実証試験の方法

基本的な性能試験及び実用的な性能試験において、以下の操作は共通である。

ア．製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、品質管理マニュアルに規定した ELISA 法試験標準作業書に従って行う。

イ．検量線作成用標準溶液の調製

キットに付属するフルトラニル標準試薬を用い、キットが指定する調整方法で、濃度系列（以下、指定濃度系列）を作成する。

ウ．吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（TECAN 社製スペクトラサーモ）で測定し、指定濃度系列及び各試験用試料溶液の吸光度とする。

エ．検量線の作成

波長450nm においてプレート毎に同時に測定したゼロブランク（添付の希釈液等）及び標準溶液指定濃度系列の吸光度（３重測定の平均値）から、４-parameter logistic fitting後、検量線を作成する。

（検量線作成用の解析ソフト：和光純薬（株）製LS-PLATEmanager 2001）

オ．実測濃度の算出

前項で作成した検量線を用いて、各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出する。

（1）基本的な性能試験

実証対象製品の基本的な性能を検討するため、製品仕様の信頼性等の観点から市販標準品（以下、市販標準物質）で調製した試験用試料溶液を用いた実証試験を行う。

○　試験用試料溶液の調製

フルトラニルの市販標準物質（和光純薬製フルトラニル標準品（残留農薬試験用））を用いて、10％メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液を調製する。

標準溶液指定濃度系列及び試験用試料溶液の調製濃度は、表 4.4.1 のとおりである。

表 4.4.1　標準溶液指定系列及び試験用試料溶液

試験項目	物質名	試料溶液調製濃度
標準溶液指定濃度系列	フルトラニル	0，1，2，4，8μg/L
①測定範囲 ④日間再現性 ⑤期間再現性 ⑥プレート間再現性	フルトラニル	0，1，2，4，8μg/L
②検出下限及び定量下限	フルトラニル	1μg/L
③繰返し再現性	フルトラニル	2μg/L
⑦交差反応性	メプロニル オキシカルボキシン	0,0.1,1,10,100 μg/L 0,4,10,25,60 mg/L

①　測定範囲試験

調製した試験用試料溶液を用いて、各調製濃度につき３重測定を行い、３個の吸光度それぞれから求めた実測濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求める。

これを基に、各調製濃度と実測濃度との比較、変動係数から指定された測定範囲の妥当性について検討する。

②　検出下限及び定量下限試験

測定範囲の下限付近に調製した試験溶液を８回測定し、その実測濃度より標準偏差（SD）を求める。求めた SD から 3SD 及び 10SD をそれぞれ検出下限及び定量下限とし、申請データと比較検討する。

③　繰返し再現性試験

測定範囲の直線域に調製した試料溶液を3重測定で8回測定し、３重測定の平均吸光度から算出した8個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求める。

求めた変動係数（n=8）から、繰返し再現性について検討する。

④　日間再現性試験

同一測定者が 1 週間の異なる 3 日間において、同一ロットの異なるプレートを用いて「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、3 日間の比較から日間再現性について検討する。

⑤　期間再現性試験

同ロット（製造年月日が同じ）の２枚のプレートを用いて、1 ヶ月以上離れた時期に「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、プレート間の比較から期間再現性について検討する。

⑥　プレート間再現性試験

同一ロット 2 プレート及び異なるロット 1 プレートの 3 プレートを用いて、同日に「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、同一ロット及び異なるロットの比較からプレート間再現性について検討する。

⑦　交差反応性試験

フルトラニル及び類似物質（メプロニル、オキシカルボキシン）について調製した試料溶液で吸光度曲線（実測値は 3 重測定の平均値から求める）を描き、吸光度曲線から類似物質の 50%発色阻害濃度を求める。（フルトラニルの 50%阻害濃度/類似物質の 50%阻害濃度）×100（%）で交差率を求め、類似物質の交差反応性を検討する。

類似物質に関して、調製した試料溶液のみでは 50%発色阻害濃度が求められない場合は、50%発色阻害濃度が得られるように高濃度側を加えた濃度系列を作り、試験をやり直す。予想される高濃度側の濃度範囲が実用的でない場合には、20 または 10%阻害濃度で代用する。

（２）実用的な性能試験

実証対象製品の実用的な性能を検討するため、環境試料への適用性等の観点から環境試料試験による実証試験を行う。

①　回収特性試験

グラスファイバーフィルター（GFC：孔径 1.2μm）を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに測定範囲の中央付近となるように市販標準物質（フルトラニル）を添加するとともに、妨害物質としてフミン酸ナトリウムを一定濃度添加して、試験用試料溶液を調製する。試験用試料溶液の調製濃度（添加濃度）は、表 4.4.2 のとおりである。

調製した試験用試料溶液について、３重測定した実測濃度から平均値、回収率を求め、フミン酸ナトリウムに対する製品の回収特性を検討する。

表 4.4.2 試験用試料溶液

物質名	試料溶液調製濃度
分析対象物質：フルトラニル	2μg/L
妨害物質：フミン酸ナトリウム	0，1，5，10，50 mg/L

②　測定精度試験

３地点から採取した河川水について、グラスファイバーフィルターによるろ過及び固相カートリッジを用いた固相抽出法による前処理を行って測定する。

同一河川水について、所定の標準作業書に従って機器分析を行い、ELISA 法と機器分析法の実測値を比較し、環境試料への適用可能性について検討する。

また、製品の操作簡便性（測定時間、操作数）について、環境試料への適用性の観点から検討する。

５．データの品質管理

実証試験は、品質管理マニュアルに従って行い、作成した文書及び記録については、適切に保管・管理する。

６．データの管理、分析、表示

（１）データの管理

実証試験で得られたデータは、品質管理マニュアル従い識別し、適切に収集し、見出し付け、ファイリングし、10 年間維持した後、廃棄するものとする。

（２）データの分析と表示

実証試験で得られたデータは、必要に応じて統計処理を行うとともに、使用した数式を実証試験結果報告書に記載する。

７．監査

実証試験が適切に実施されていることを確認するために実証試験の期間中に１回以上品質管理マニュアルに従い監査を実施する。

８．実証試験の評価

実証試験結果の評価は、3.2 実証対象製品のデータと本実証試験結果を比較し評価する。

なお、3.2 実証対象製品のデータがないものについては、ELISA 法による一般的な製品のデータを参照して評価する。

また、「実用的な性能試験」結果については、環境試料への適用性等の観点から評価する。

付録０：取扱説明書

研究用試薬

スマートアッセイ シリーズ

フルトラニル測定キットＥ

Ver 1

１．はじめに

本品は、従来の機器分析法とは全く異なる原理、抗フルトラニル抗体の特異的反応を利用した酵素免疫測定法（Enzyme‐linked Immunosorbent Assay、ELISA）によるフルトラニルの測定キットです。測定に必要な全ての試薬をパッケージしており、煩雑な試薬調製の必要がなく、測定したい時にすぐにお使いいただけます。

＊登録業者；日本農薬,日産化学

２．測定原理

本キットは、環境水中のフルトラニルを直接競合ELISA法で測定するものです。

フルトラニルと特異的に反応する抗体を固相化したマイクロプレートに、フルトラニル（標準試液または試料溶液）とフルトラニル酵素標識物溶液の等量混合液を加えて競合反応させます。反応終了後、未反応物を洗浄除去し発色試薬を加えると、固相化抗体に結合した酵素標識物の酵素反応によって発色試薬中のテトラメチルベンジジンが酸化され、発色します。発色反応を発色停止試薬で停止させた後、450nmの吸光度を測定します。吸光度は、標準溶液または試料溶液中のフルトラニル濃度が高いほど低下します。標準溶液のフルトラニル濃度とその吸光度の関係からフルトラニル濃度を求めます。

３．測定キットの特徴

1）**高感度**－フルトラニルを1～8 ppbの範囲で測定できます。
2）**簡便**－機器分析法に比べ試料の煩雑な前処理を必要とせず、簡易な操作で測定できます。
3）**迅速**－前処理が簡単なため､短時間で多くの試料を同時に測定できます。
4）**低コスト**－高価な機器を必要とせず､測定場所を特に選ばないため、コストを安くできます。

４．測定キットの構成

１キットに含まれる試薬の内訳は、第１表の通りです。

第１表　キットの構成

	品名	容量	剤型	数量
①	フルトラニル抗体プレート	８ウエル×12列（96ウエル）	乾燥品	１枚
②	フルトラニル標準試薬C1（1 ppb）	1 mL	凍結乾燥品	2バイアル
③	フルトラニル標準試薬C1（2 ppb）	1 mL	凍結乾燥品	2バイアル
④	フルトラニル標準試薬C1（4 ppb）	1 mL	凍結乾燥品	2バイアル
⑤	フルトラニル標準試薬C1（8 ppb）	1 mL	凍結乾燥品	2バイアル
⑥	フルトラニル酵素標識物試薬	6 mL	凍結乾燥品	2バイアル
⑦	洗浄試薬（10倍濃縮）	50 mL	液状品	1バイアル
⑧	発色試薬	13 mL	液状品	1バイアル
⑨	発色停止試薬	13 mL	液状品	1バイアル
⑩	プレートシール			1枚

５．測定に必要な材料・装置

（1）試薬
①フルトラニル測定キットＥ：ホリバ･バイオテクノロジー社製
②精製水
③メタノール：環境分析用
④10%メタノール：精製水を用いて10倍希釈

（2）器具
①マイクロピペット（50～200 μL,1000 μL）および専用チップ
②メスシリンダー：500 mL
③試験管：ガラス製、10 mL
④ホールピペット：ガラス製
⑤メスフラスコ：ガラス製
⑥ガラス繊維フィルター（ADVANTEC 社製 GLASS FIBER FILTER GA-55または同等品）

（3）装置
①ストップウォッチ：秒単位まで表示
②試験管ミキサー
③マイクロプレートリーダー:スマートリーダー（ホリバ・バイオテクノロジー社製）
④マイクロプレート洗浄機:スマートウォッシャー(ホリバ・バイオテクノロジー社製)

６．溶液の調製

（1）フルトラニル抗体プレート
そのまま用います。

（2）フルトラニル標準試液
フルトラニル標準試薬C1、C2、C3およびC4に10%メタノール1ml をマイクロピペットで加えて溶解し、それぞれフルトラニル標準溶液C1からC4とします。溶解後の濃度は、それぞれ1、2、4および8ppbです。

（3）フルトラニル酵素標識物試液
酵素標識物試薬に精製水 6 mLを加えて溶解し、フルトラニル酵素標識物試液とします。

（4）洗浄溶液
洗浄試薬に、精製水450 mLをメスシリンダーで加えて希釈し、洗浄溶液とします。

（５）発色試薬
　そのまま用います。
（６）発色停止試薬
　そのまま用います。

７．測定操作

１）測定方法

ろ　過
試料をガラス繊維フィルター等を用いてろ過し、メタノール 10%溶液を調製し、試料溶液とします。

↓

混合液の調製
フルトラニル標準溶液または試料溶液 150μL をマイクロピペットで試験管に取り、それぞれにフルトラニル酵素標識物溶液 150μL をマイクロピペットで加えて混合し、標準混合液または試料混合液とします。

↓

競合反応
抗体プレートのウェルに、標準混合液または試料混合液 100 μL ずつをマイクロピペットで分注します。ついで、ストリップの使用ウェルに合わせて切断したプレートシールを貼り、室温(15～25℃)で１時間反応させます。
※専用のマイクロプレートリーダー“スマートリーダー”を用いて測定を行う場合は、標準混合液の配置が決まっていますので、リーダーの取扱説明書に従って使用して下さい。

↓

プレートの洗浄
反応液を吸引除去し、洗浄溶液 300 μL で 3 回洗浄します。
※ウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。
※測定の迅速性と定量精度を高めるため、専用の洗浄機のご使用をお勧めします。

↓

発色反応､発色反応停止
マイクロピペットで発色試薬 100 μL を加えて室温(15～25℃)で 10 分間反応させた後、発色停止試薬 100 μL をマイクロピペットで添加して下さい。
※発色試薬を加えると時間と共に青色に、発色停止試薬を加えると瞬時に黄色に呈色します。
※各ウェルの発色反応時間が一定になるように注意して下さい。

↓

吸光度測定
波長 450 nm における吸光度を、マイクロプレートリーダーにより測定します。
※吸光度測定は発色反応停止後 15 分以内に行なって下さい。
※“スマートリーダー”を使用いただくことにより、煩雑な濃度計算が自動的になされ、表示されます。

２）試料中のフルトラニル濃度の計算
　回帰式によって算出します。リーダーに付属している演算ソフト等により回帰式を求め、濃度を算出して下さい。式のＹに試料の吸光度を代入しフルトラニル濃度(Ｘ)を求めることができます。専用のマイクロプレートリーダー“スマートリーダー”を用いて算出した回帰曲線と式を例として第１図に示します。

$Y=-0.066+(1.301+0.066)/1+10^{(\log X-\log 2.1)}$

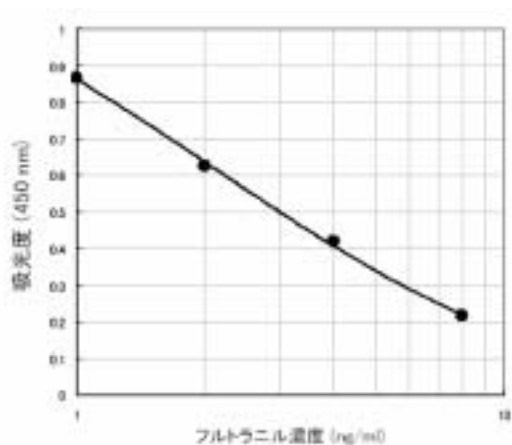



図１　回帰曲線および回帰式の例

８．測定キットの反応特性

　本キットに用いている抗体の各種農薬に対する交差反応性は、第２表の通りです。

第２表　各種農薬との交差反応性

農薬	商品例	交差反応性(%)
フルトラニル	モンカット	100
メプロニル	バシタック	30.1
オキシカルボキシン	プラントバックス	＜0.1
フラメトピル	リンバー	＜0.1
プロピコナゾール	チルト	＜0.1
メタラキシル	リドミル	＜0.1
フサライド	ラブライド	＜0.1
ブプロフェジン	アプロード	＜0.1
エトフェンプロックス	トレボン	＜0.1
クロルピリフォスメチル	レルダン	＜0.1
フェントエート	エルサン	＜0.1
フェニトロチオン	スミチオン	＜0.1

９．貯法・有効期間

貯　　法：遮光して 2～8 ℃に保存します。
有効期間：パッケージの外面に表示してあります。

１０．注意事項

　使用前に、取扱説明書をよくお読みいただき、注意事項をお守りください。

１）一般的な注意事項

① 本キットは、食品衛生･環境等に関わる自主検査用です。測定結果の判断と運用は、すべてお客様自身の責任で行ってください。
② 責任ある管理者の指導のもとに、保護手袋、保護メガネ等を着用して安全に取り扱って下さい。
③ 吸飲したり、皮膚と接触したりすると有害な試薬類が含まれています。身体に異常を感じた場合は、直ちに医師の手当てを受けてください。
④ 保管・廃棄する場合には、衛生面、環境面に十分配慮し、法規を遵守してください。フルトラニルを含む廃液、発色反応停止後の液(希硫酸を含む)は回収し、環境中に廃棄しないでください。

⑤ 本キットを一度に使い切らなかった場合は､各容器を密封し、取扱説明書と共に保管してください。

２）測定操作上の注意事項

① 本キットは､使用 30 分程前に冷蔵庫から取出し、室温に戻してからご使用ください。
② 異なるロットの試薬を組合わせて使用しないでください。
③ マイクロプレートは、各 8 ウェルずつのストリップタイプになっていますので､必要なウェル数のみを用意し、残りはラミネート袋に戻し、密封して冷蔵保存してください。また、抗体プレートを取扱う際は､裏面を汚さないようにしてください。
④ 正確な分析を行うため､試薬の溶解・希釈操作は可能な限り正確に行ってください。また、各反応時間を厳守してください。
⑤ 検量線は、測定ごとに作成してください。
⑥ 測定は少なくとも 2 重測定で行ってください。
⑦ 測定は、検量線範囲内の濃度（1 ～8 ppb）で行って下さい。8 ppb を超える高濃度の測定試料の場合は､10%メタノールで追加希釈した後再測定してください。
⑧ 競合反応後の洗浄ではウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。
⑨ 発色および発色停止反応時の各ウェルの反応時間が一定になるように調整してください。
⑩ 本キットは、メプロニルと 30.1%の交差反応性がありますのでご注意ください。

株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
〒601－8315　京都市南区吉祥院車道町 48 番地
TEL.075－692－1786　FAX.075－692－1790
http://www.horiba-biotech.co.jp

付録１：技術仕様書

測定範囲の設定（フルトラニル）

1.　検量線作成及び測定範囲の上限値と下限値の設定
1-1.目的
吸光度がBo（農薬無添加区）の20%～80%に相当する濃度を検量線から読み取り、測定範囲を設定する。

1-2.材料

キット用抗体ﾌﾟﾚｰﾄ
キット用酵素標識物試薬
検量線用標準液
発色液（TMB試薬）
発色停止液（1N 硫酸）

1-3.方法
1-3-1.抗体プレート
4℃で保管してあるキット用抗体プレートを30分間25℃に静置して、使用した。

1-3-2.酵素標識物試液の調製
4℃で保管してあるキット用酵素標識物試薬を30分間25℃に静置した。
↓
蒸留水6mLで溶解し、酵素標識物試液とした。

1-3-3.検量線溶液の調製
標準品10mgを10mLメスフラスコに入れて、メタノールでフィルアップし、
1000ppm標準品メタノール溶液を調製した。
↓
メタノールで10倍段階希釈し、10ppmの検量線用標準液を調製した。
↓
検量線用標準液を2倍希釈で表に示すように希釈列を調製した。
↓
検量線溶液の調製　　　(2倍希釈)

	1	2	3	4	5	6	7
検量線用標準液　(ppm)	2.5	1.25	0.63	0.16	0.08	0.04	0
希釈後　(ppb)	25	12.5	6.3	1.6	0.8	0.4	0

試験管に4mLの10%メタノールをとり、検量線用標準液を各試験管に40μl添加して、
検量線溶液とした。

1-3-4.アッセイ
検量線溶液と酵素標識物溶液を等量混合して、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄3回実施した。
発色液を100μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止
反応停止液100μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　　　　※測定機：スマートリーダー

1-4.結果
（農薬添加区の吸光度）／（農薬無添加区の吸光度）の値（B/Bo）について、
B/Bo=0.8付近の濃度（測定下限；L）として1 ppb、及びB/Bo=0.2付近の濃度（測定上限；H)として
8 ppbを選定して、測定範囲上限および下限に設定した。

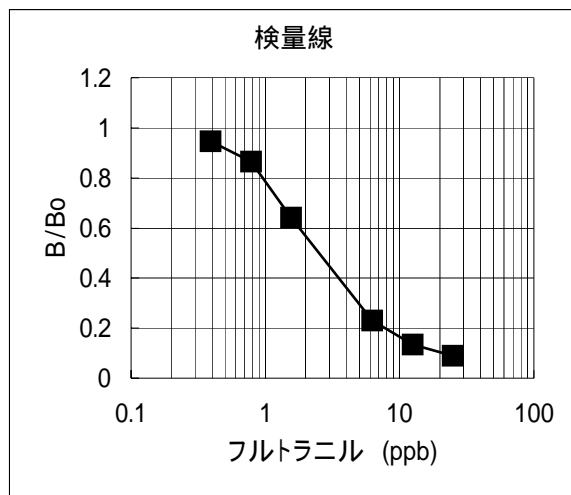



図１．フルトラニル検量線（B/Bo表示）

付録１：技術仕様書

測定範囲の設定（フルトラニル）

２．　有意差検定
2-1.目的
設定した測定範囲の下限値（1 ppb）と上限値（8 ppb）のBo及び試薬ブランクに
対する有意差を確認する。

2-2.材料
フルトラニル測定キット

2-3.方法
2-3-1.キットの調製
4℃保存キットを30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。
標準試薬に10%メタノール　1.0mLを添加、溶解して標準試液（L, H）とした。

2-3-2.アッセイ
標準試液（L, H）と酵素標識物溶液、又は10%メタノールと酵素標識物溶液を等量
混合して、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄3回実施した。
発色液を100μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止
反応停止液100μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　　　　　　　　　　　　※測定機：スマートリーダー

2-3-3.検定方法
Boの吸光度と標準試液Lの吸光度、及び標準試液Hの吸光度と試薬ブランクの吸光度との間の
ｔ検定（等分散と仮定した2標本による検定：有意水準＝５％）を実施した。
なお、試薬ブランクは発色液と反応停止液のみを添加したものである。

2-4.結果

表1-1.
BoとLとの間の有意差検定

	Bo	L
平均	1.038375	0.8185
分散	0.002334	0.002208
観測数	8	8
プールされた分散	0.002271	
仮説平均との差異	0	
自由度	14	
t	9.227799	
P(T<=t) 片側	1.25E-07	
t 境界値 片側	1.761309	
P(T<=t) 両側	2.50E-07	
t 境界値 両側	2.144789	

表1-2.
Hと試薬ブランクとの間の有意差検定

	H	試薬ブランク
平均	0.218625	0.05075
分散	0.000215	6.28E-05
観測数	8	8
プールされた分散	0.000139	
仮説平均との差異	0	
自由度	14	
t	28.51185	
P(T<=t) 片側	4.21E-14	
t 境界値 片側	1.761309	
P(T<=t) 両側	8.41E-14	
t 境界値 両側	2.144789	

BoとLのｔ検定結果
ｔ＞ｔ境界値片側　であり、BoとLとの間には有意差が認められた

Hと試薬ブランクのｔ検定結果
ｔ＞ｔ境界値片側　であり、Hと試薬ブランクとの間には有意差が認められた

2-5.考察
t検定からBoの吸光度とLの吸光度との間、およびHの吸光度と試薬ブランクの
吸光度との間に有意差があることから、測定範囲の設定の妥当性が確認できた。

付録２：自社による性能試験結果

再現性（フルトラニル）

１．目的
キットの再現性（同時、日間）を確認する。

２．材料
フルトラニル測定キット
ほうれんそう
1000ppm　標準品メタノール溶液

３．方法
3-1.添加用標準液の調製
1000ppm　標準品メタノール溶液
↓
メタノールを用いて下記の表の様に添加用標準液を調製した。
添加用標準液の濃度

	A	B	C	B0
標準液（ppm）	1.0	0.75	0.5	0.0

3-2.測定試液の調製
農産物試料
↓
磨砕：農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。
↓
ペースト5ｇを 50mL遠沈管×3個にそれぞれ正確に量りとった。
↓
添加用標準液をそれぞれ下記の表のようにずつ添加した。
↓

添加用標準液の濃度およびサンプル中の農薬濃度

添加試料	添加用標準液調製濃度 μｇ/mL	ホモジネート中農薬濃度 ppm	抽出・希釈後濃度 ppb	添加量 mL
A	1.00	0.20	3.9	1.0
B	0.75	0.15	2.9	1.0
C	0.5	0.1	2.0	1.0

↓
遠沈管のふたを閉め、よく振った。
↓
メタノール25mLを添加した。
↓
振とう機（120回/分)で30分間振とうした。
↓
綿球を詰めたシリンジでろ過した。
ろ液を標準品を添加した農産物抽出液(85%MeOH相当）とした。
↓
標準品を添加した農産物抽出液1mLをﾊﾞｲｱﾙ瓶にとり、7.5mLの蒸留水を
添加し、よく混和した。（8.5倍希釈）これを測定試液とした。

3-3.キットの調製
4℃で保管してある抗体プレート、酵素標識物試薬、標準試薬を取り出し、30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。
標準試薬に10%メタノール　1.0mLを添加、溶解して標準試液とした。

付録２：自社による性能試験結果

3-4.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と測定試液、又は酵素標識物試液と標準試液を等量混合し、混合試液とした
↓
各混合試液を抗体プレートに100μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄3回実施した。
発色液を100μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止
反応停止液100μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　※測定機：スマートリーダー

3-5. 同時再現性
濃度の異なる３試料を各々8点おき、各点ごとに濃度を測定して、値のばらつき具合を確認した。

3-6. 日間再現性
同一測定者が日を変えて3回行った。（８重測定）

４．結果
表2-1. 同時再現性

	測定値　(ppb)		
	試料　A	試料　B	試料　C
1	4.9	3.5	2.5
2	5.4	3.9	2.7
3	5.0	3.8	2.5
4	5.5	4.1	2.8
5	4.7	4.0	2.7
6	5.1	4.0	2.9
7	5.3	4.0	2.5
8	5.3	3.8	2.8
平均	5.1	3.9	2.7
標準偏差	0.29	0.19	0.16
変動係数　(%)	5.6	4.8	6.0

表2-2. 日間再現性

	測定値　(ppb)		
	試料　A	試料　B	試料　C
1日目	5.1	4.3	2.8
2日目	5.0	4.0	2.6
3日目	5.1	3.9	2.7
平均	5.1	4.1	2.7
標準偏差	0.06	0.22	0.13
変動係数　(%)	1.2	5.4	4.9

５．考察
ほうれんそうの粉砕試料にフルトラニルを添加した3試料を用いて、同時再現性および日間再現性を検討した。結果は、それぞれ表2-1及び2-2に示す通りで変動係数が各々4.8～6.0及び1.2～5.4%であり、同時再現性及び日間再現性は良好であった。

付録２：自社による性能試験結果

資料３

保存安定性試験（フルトラニル）

１．目的
キットの8℃における保存安定性を確認する。

２．材料
フルトラニル測定キット：2ロット

３．方法
3-1.キットの調製
8℃保存キットを30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

標準試薬に10%メタノール　1.0mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-2.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と標準試液及び酵素標識物試液と10%メタノールを
等量混合して、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄３回実施した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止
反応停止液100μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　　　　　　　　　　測定機：スマートリーダー

付録２：自社による性能試験結果

４．結果

4-1.1ロット目

表3-1　キットの保存安定性試験（1ロット目）

		保存日数							
		0	28	90	180	270	300	330	360
Bo	吸光度	0.887	0.831	0.902	0.878	0.939	0.764		0.808
	SD	0.025	0.024	0.030	0.038	0.043	0.029		0.040
	CV(%)	2.8	2.9	3.4	4.4	4.6	3.8		5.0
	相対値※	100.0%	93.7%	101.7%	99.0%	105.9%	86.1%		91.1%
標準品L	吸光度	0.727	0.645	0.658	0.709	0.724	0.635		0.637
	B/Bo	0.82	0.78	0.73	0.81	0.77	0.83		0.79
	SD	0.017	0.027	0.019	0.031	0.028	0.025		0.017
	CV(%)	2.4	4.3	2.9	4.4	3.8	4.0		2.7
	相対値※※	100.0%	88.7%	90.5%	97.5%	99.6%	87.3%		96.1%
標準品H	吸光度	0.204	0.175	0.185	0.201	0.197	0.178		0.166
	B/Bo	0.23	0.21	0.21	0.23	0.21	0.23		0.20
	SD	0.011	0.027	0.013	0.016	0.003	0.004		0.009
	CV(%)	5.4	15.4	6.9	7.7	1.6	2.5		5.2
	相対値※※	100.0%	85.8%	90.7%	98.5%	96.6%	87.3%		89.5%
Boｺﾝﾄﾛｰﾙ	吸光度	0.998	0.923	0.865	0.928	1.072	0.888		0.808
	SD	0.015	0.036	0.013	0.017	0.029	0.014		1.000
	CV(%)	1.5	3.9	1.5	1.9	2.7	1.6		0.0
	相対値※	100.0%	92.5%	86.7%	93.0%	107.4%	89.0%		80.9%

4-2.2ロット目

表3-2　キットの保存安定性試験（2ロット目）

		保存日数							
		0	28	90	180	270	300	330	360
Bo	吸光度	1.001	0.978	0.948	0.871	0.863	0.842	0.807	0.828
	SD	0.049	0.039	0.014	0.021	0.030	0.026	0.025	0.032
	CV(%)	4.9	3.9	1.5	2.4	3.5	3.1	3.1	3.9
	相対値※	100.0%	97.7%	94.7%	87.0%	86.2%	84.1%	80.6%	82.7%
標準品L	吸光度	0.821	0.748	0.778	0.726	0.672	0.709	0.657	0.693
	B/Bo	0.82	0.77	0.82	0.83	0.78	0.84	0.81	0.84
	SD	0.018	0.017	0.018	0.034	0.010	0.016	0.029	0.032
	CV(%)	2.1	2.3	2.3	4.6	1.4	2.3	4.4	4.6
	相対値※※	100.0%	93.4%	100.1%	101.7%	95.1%	102.8%	99.4%	102.3%
標準品H	吸光度	0.224	0.219	0.217	0.212	0.206	0.184	0.189	0.208
	B/Bo	0.22	0.22	0.23	0.24	0.24	0.22	0.23	0.25
	SD	0.007	0.011	0.015	0.010	0.009	0.011	0.009	0.012
	CV(%)	3.1	5.1	6.8	4.9	4.2	6.2	4.8	6.0
	相対値※※	100.0%	97.8%	96.9%	94.6%	92.0%	82.3%	84.4%	92.9%
Boｺﾝﾄﾛｰﾙ	吸光度	1.237	0.909	1.120	1.193	1.054	1.039		1.039
	SD	0.063	0.021	0.049	0.069	0.026	0.025		0.043
	CV(%)	5.1	2.4	4.4	5.8	2.4	2.4		4.1
	相対値※	100.0%	73.5%	90.5%	96.4%	85.2%	84.0%		84.0%

※　0日目の吸光度を基準とした相対値

※※　0日目のB/Boを基準とした相対値

５．考察

2ロットの保存安定性試験を実施した結果、2ロット目28日目のBoコントロールが相対値73.5％であったが
360日経過後の試験では2ロットともBoｺﾝﾄﾛｰﾙは相対値80％以上を維持していた。
また標準試薬についても2ロットとも劣化を認めなかったことから
本キットは8℃保存360日経過後使用可能な性能を維持していると考えられる。

付録２：自社による性能試験結果

交差反応性（フルトラニル）

１．目的
本キットの、類似構造農薬及び代表的農薬の交差反応性を確認した。

２．材料
フルトラニル測定キット（標準試薬は除く）
対象農薬の標準品

1 メプロニル
2 オキシカルボキシン
3 フラメトピル
4 プロピコナゾール
5 メタラキシル
6 フサライド
7 ブプロフェジン
8 エトフェンプロクス
9 クロルピリホスメチル
10 PAP
11 MEP

３．方法
3-1.交差反応性測定用試液の調製
標準品をメタノールで溶解して段階希釈し希釈列を調製した。
試験管に4mLの10％メタノールをとり、希釈列を各試験管に40μl添加して、
交差反応性測定用試液とした。

3-2.キットの調製
4℃保存キットを30分間25℃に静置した。
↓
キット用酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

3-3.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と交差反応性測定用試液を等量混合し、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄3回実施した。
発色液を100μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止
反応停止液100μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　※測定機：スマートリーダー

3-4. 交差反応性の算出
測定結果からIC_{50}値を求めたのち、交差反応性を算出した。
計算式は以下のとおりである。
交差反応性（％）＝IC_{50}値（フルトラニル）／IC_{50}値（対象農薬）×100

付録２：自社による性能試験結果

４.結果

表3　交差反応性一覧

農薬	交差反応性(%)
フルトラニル	100
メプロニル	30.1
オキシカルボキシン	<0.1
フラメトピル	<0.1
プロピコナゾール	<0.1
メタラキシル	<0.1
フサライド	<0.1
ブプロフェジン	<0.1
エトフェンプロクス	<0.1
クロルピリホスメチル	<0.1
PAP	<0.1
MEP	<0.1

５．考察

各種農薬に対する本キットの交差反応性は、表に示す通りで、・
類似構造のメプロニルに30.1%の交差反応性を示したが、
他の対象農薬に交差反応性は認められなかった。

付録２：自社による性能試験結果

添加回収試験(フルトラニル)

１．目的
農産物に添加したフルトラニルの回収率を確認する。

２．材料
フルトラニル測定キット
ほうれんそう
1000ppm　標準品メタノール溶液

３．方法
3-1.添加用標準液の調製
1000ppm　標準品メタノール溶液
↓
メタノールを用いて50ppmの添加用標準液を調製した。

3-2.測定試液の調製
農産物試料
↓
磨砕：農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。
↓
ペースト5ｇを 50mL遠沈管×3個にそれぞれ正確に量りとった。
↓
添加用標準液をそれぞれ下記の表のようにずつ添加した。
↓

添加用標準液の濃度およびサンプル中の農薬濃度

添加試料	添加用標準液調製濃度	ホモジネート中農薬濃度	抽出・希釈後濃度	添加量
	μｇ/mL	ppm	ppb	mL
A	1.00	0.20	3.92	1.00
B	0.75	0.15	2.94	1.00
C	0.50	0.10	1.96	1.00

↓
遠沈管のふたを閉め、よく振った。
↓
メタノール25mLを添加した。
↓
振とう機（120回/分)で30分間振とうした。
↓
綿球を詰めたシリンジでろ過した。
ろ液を標準品を添加した農産物抽出液(85%MeOH相当）とした。
↓
標準品を添加した農産物抽出液1mLをバイアル瓶にとり、7.5mLの蒸留水を
添加し、よく混和した。（8.5倍希釈）これを測定試液とした。

3-3.キットの調製
4℃で保管してある抗体プレート、酵素標識物試薬、標準試薬を取り出し、30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。
標準試薬に10%メタノール　1.0mLを添加、溶解して標準試液とした。

付録２：自社による性能試験結果

3-4.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と測定試液、酵素標識物試液と標準試液及び
酵素標識物試液と10%MeOHを等量混合して、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄３回実施した。
発色液を100μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止
反応停止液100μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　　　　　　　　　　　　　　　測定機：スマートリーダー

４．結果

表4　添加回収試験

添加濃度　(ppm)	回収濃度(ppm)	回収率（%）	平均回収率（%）
0.20	0.23	113.7	119.9 ± 5.6
	0.24	121.4	
	0.25	124.6	
0.15	0.20	132.0	131.5 ± 5.3
	0.19	126.0	
	0.20	136.5	
0.10	0.11	112.4	113.3 ± 3.1
	0.12	116.8	
	0.11	110.7	

５．考察
粉砕米にフルトラニルを添加した試料について、添加回収試験を行った。
結果は表4の通り、回収率は113.3ppm～131.5ppmと幾分高い値を示したが、・
概ね良好な値を示した。なお、回収率の計算は、下記のとおりである。
回収率（%）＝（添加試料の回収濃度）／（添加濃度）×100

１．技術の先進性について

技術の先進性、特許・実用新案等の申請・取得状況、論文発表、受賞歴等があれば記入して下さい。
技術の先進性 特開平１０－７２４２０「酸アミド系化合物のハプテン化合物、抗体および測定方法」 Analytical Chemica Acta 376(1998)93-96　“Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a monoclonal antibody for a fungicide flutolanil”

２．その他

環境モニタリングへの適用性、将来の発展性、今後の取組等を記入して下さい。
フルトラニルは「水道方水質管理目標設定項目の対象（目標値 0.02mg/L 以下)、「公共用水等における農薬の水質評価指針値（0.2mg/L 以下)」や「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針値（2mg/L 以下)」が定められており、環境水での適応を確認するため申請するものです。